

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Iveta Voleská**

Identifikace nových molekulárních biomarkerů a terapeutických cílů u solidních  
nádorů

Identification of new molecular biomarkers and therapeutic targets in solid tumors

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr., Radka Václavíková Ph.D.

Praha 2021

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 10.8.2021

.....

Bc. Iveta Voleská

## **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala paní RNDr., Radce Václavíkové, PhD. za její odborné vedení, cenné rady a konstruktivní připomínky. Mé poděkování patří i celému Oddělení Toxikogenomiky SZÚ nejen za možnost vypracování této diplomové práce, ale také za jejich ochotu a vstřícnost.

Tato práce vznikla za podpory grantového projektu GAČR č. 19-03063S.

## Abstrakt

Karcinomy prsu a ovaríí patří k závažným nádorovým onemocněním žen. Poměrně vysoká mortalita ve vyšších stádiích především ovariálního karcinomu je často spojována s rozvojem rezistence vůči cytostatikům. Chemorezistence se rozvíjí na podkladě různých adaptivních mechanismů, které značně snižují účinnost léčby. Na základě vysokokapacitních sledování profilů nádorových buněk a tkání byly identifikovány molekuly *TRIP6*, *ABCC3* a *CPS1*, s potencionální rolí v rozvoji rezistence vůči taxanům. Hlavním cílem předkládané práce bylo objasnit roli či případnou souvislost těchto molekul s rozvojem rezistence nádorových buněk vůči taxanovým chemoterapeutikům na modelech senzitivních a paclitaxel-rezistentních buněk karcinomu ovaria a také v kohortách patientek s karcinomem ovaria a prsu. Práce poskytuje výsledky porovnání paclitaxelu a vybraných taxanových derivátů z hlediska účinnosti v senzitivních a rezistentních buněčných liniích ovariálního karcinomu a také objasňuje souvislost mezi odlišnou strukturou vybraných taxanových derivátů a změnou exprese *CPS1* po jejich aplikaci. Významné výsledky přináší také studie v kohortách patientek s karcinomem ovaria, kde byl odhalen významný vztah mezi vyššími hladinami genu *CPS1* a kratší dobou bezpříznakového přežívání. Tyto výsledky mohou sloužit jako podklad pro validaci získaných dat na větších kohortách pacientů a také jako základ pro další studie kandidátních molekul a jejich využití jako potencionálních biomarkerů.

**Klíčová slova:** karcinom prsu, karcinom ovaríí, taxany, chemorezistence, *TRIP6*, *ABCC3*, *CPS1*

## Abstract

Breast and ovarian cancers are the most serious cancers among women. Relatively high mortality at advanced stages of the disease is often associated with the development of resistance to the cytotoxic agents. Chemoresistance usually develops on the base of different adaptive mechanisms that significantly decrease therapy efficiency. Currently TRIP6, ABCC3 and CPS1 enzyme has been identified based on high-capacity expression profile monitoring in tumor cell and tissue profiles as one such candidate playing a role in taxane resistance. The main goal of this thesis was to clarify the role or possible association of the *ABCC3*, *CPS1* and *TRIP6* genes with the development of tumor cell resistance to taxanes in models of sensitive and paclitaxel-resistant ovarian cancer cells and in the cohorts of patients with ovarian and breast cancer. The *in vitro* part compares the efficacy of paclitaxel and taxane derivatives in the sensitive and resistant ovarian cancer cell lines and clarifies the association between the different structure of taxane derivatives and the change in *CPS1* expression after their application. The study in patient's cohorts with ovarian cancer reveals a relationship between higher levels of the *CPS1* gene and shorter progression-free survival. The achieved results may serve as a base for data validation on larger patient's cohorts, as well as it may serve as a base for further studies monitoring the potential use of the studied molecules as molecular biomarkers.

**Klíčová slova:** breast cancer, ovarian cancer, taxanes, chemoresistance, *TRIP6*, *ABCC3*, *CPS1*

# Obsah

|  |    |
|--|----|
| Seznam zkratk .....  | 10 |
| 1 Úvod.....  | 12 |
| 2 Přehled literatury.....  | 14 |
| 2.1 Nádorová onemocnění.....   | 14 |
| 2.1.1 Kancerogeneze a typické znaky nádorových buněk .....                       | 15 |
| 2.2 Ovariální karcinomy, jejich diagnostika a klasifikace .....                  | 17 |
| 2.3 Karcinomy prsu, jejich diagnostika a klasifikace .....                       | 21 |
| 2.4 Terapeutické možnosti nádorových onemocnění .....                            | 24 |
| 2.4.1 Terapie karcinomu prsu a ovaria.....                                       | 26 |
| 2.5 Využití taxanů v protinádorové terapii.....                                  | 28 |
| 2.5.1 Mechanismus účinku.....  | 28 |
| 2.5.2 Metabolismus a transport taxanů .....                                      | 30 |
| 2.5.3 Rezistence vůči taxanům a mechanismy jejího rozvoje.....                   | 31 |
| 2.6 Nové mechanismy rezistence a potencionální biomarkery léčebné odpovědi ..... | 33 |
| 2.6.1 Nové taxanové deriváty.....  | 34 |
| 2.6.2 <i>TRIP6</i> a rezistence.....   | 35 |
| 2.6.3 <i>CPS1</i> a rezistence .....   | 37 |
| 2.6.4 <i>ABCC3</i> a rezistence .....  | 39 |
| 2.6.5 MiRNA a rezistence .....   | 41 |
| 3 Cíl práce .....  | 44 |
| 4 Metodika .....   | 46 |
| 4.1 Seznam použitých reagensí .....  | 46 |
| 4.2 Seznam použitých přístrojů a softwaru .....                                  | 47 |
| 4.3 Metody práce s klinickými vzorky .....                                       | 47 |
| 4.3.1 Izolace nukleových kyselin a proteinu z nádorové tkáně.....                | 48 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 4.3.1.1 | Izolace kitem AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit (QIAGEN).....   | 49 |
| 4.3.1.2 | Izolace celkové RNA Trizolem.....   | 51 |
| 4.3.2   | Měření koncentrace RNA .....  | 52 |
| 4.3.3   | Syntéza cDNA.....   | 54 |
| 4.3.3.1 | Syntéza cDNA pro stanovení exprese miRNA .....  | 55 |
| 4.3.3.2 | Kontrola kvality cDNA .....   | 56 |
| 4.3.4   | Stanovení genové exprese <i>ABCC3</i> , <i>CPS1</i> a <i>TRIP6</i> ve vzorcích cDNA                                     | 57 |
| 4.3.5   | Stanovení genové exprese miRNA .....  | 60 |
| 4.3.6   | Statistické vyhodnocení genové a miRNA exprese ve vzorcích karcinomu ovarií a karcinomu prsu.....                       | 62 |
| 4.4     | Metody <i>in vitro</i> části studie .....   | 64 |
| 4.4.1   | Práce s buněčnými kulturami .....   | 65 |
| 4.4.2   | Stanovení cytotoxicity taxanů pomocí fluorescenčního Cell Titer Blue kitu.....  | 65 |
| 4.4.3   | Stanovení genové exprese <i>ABCC3</i> , <i>TRIP6</i> a <i>CPS1</i> v buněčných kulturách .....                          | 67 |
| 4.4.4   | Statistické vyhodnocení genové exprese v tkáňových kulturách .....  | 68 |
| 5       | Výsledky .....  | 69 |
| 5.1     | Studie s klinickými vzorky .....  | 69 |
| 5.1.1   | Studium exprese kandidátních genů <i>ABCC3</i> , <i>CPS1</i> a <i>TRIP6</i> u pacientek s karcinomem ovaria a prsu..... | 69 |
| 5.1.2   | Vztahy mezi expresí kandidátních genů a klinicko-patologickými daty pacientek s karcinomem prsu a ovaria .....          | 76 |
| 5.1.3   | Expresí kandidátních genů a přežívání pacientek s karcinomem prsu a ovaria.....   | 82 |
| 5.1.4   | Expresí miRNA s cílovým genem <i>ABCC3</i> u pacientek s karcinomem prsu.....   | 84 |
| 5.2     | <i>In vitro</i> studie.....   | 86 |



|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 5.2.1 | Porovnání účinnosti paclitaxelu a nových taxanových SBT derivátů v senzitivních a rezistentních liniích karcinomu ovaria ..... | 86  |
| 5.2.2 | Expresí kandidátních genů v senzitivních a rezistentních liniích karcinomu ovaria.....   | 87  |
| 5.2.3 | Vliv taxanů na expresi <i>CPS1</i> v senzitivních a rezistentních liniích karcinomu ovaria.....                                | 89  |
| 6     | Diskuze.....   | 92  |
| 6.1   | Klinická část studie.....  | 92  |
| 6.1.1 | Studie genové exprese <i>ABCC3</i> , <i>CPS1</i> , <i>TRIP6</i> u pacientek s karcinomem ovaria a prsu .....                   | 92  |
| 6.1.2 | Zavedení metodiky stanovení exprese miRNA.....   | 96  |
| 6.2   | In vitro studie.....   | 98  |
| 6.2.1 | Účinnost paclitaxelu a SB-T taxanových derivátů v buněčných liniích karcinomu ovaria.....                                      | 98  |
| 6.2.2 | Studie genové exprese <i>ABCC3</i> , <i>CPS1</i> , <i>TRIP6</i> v buněčných liniích karcinomu ovaria.....                      | 99  |
| 7     | Souhrn .....   | 101 |
| 8     | Seznam použité literatury .....  | 103 |
|       | Přílohy.....   | 119 |
|       | Příloha I.....   | 119 |

## Seznam zkratek

|                        |  |  |
|------------------------|--|--|
| <b>ABC</b>             | <i>ATP-binding cassette</i>                                      | ATP vazebná kazeta   |
| <b>ABCC</b>            | <i>ATP-binding cassette subfamily C</i>                          | ATP vazebná kazeta podrodina C                               |
| <b>ABCC3</b>           | <i>ATP binding cassette subfamily C member 3</i>                 | ATP vazebná kazeta typu C3                                   |
| <b>AMPK</b>            | <i>AMPC-activated protein kináz</i>                              | AMP-aktivovaná kináza  |
| <b>AMT</b>             | <i>Aminomethyltransferase</i>                                    | Aminometyltransferáza  |
| <b>ATP</b>             | <i>Adenosine triphosphate</i>                                    | Adenosintrifosfát  |
| <b>Bax</b>             | <i>Bcl-2 Associated X-protein</i>                                | Bcl-2 asociovaný protein X                                   |
| <b>BCL2</b>            | <i>B-cell lymphoma 2</i>   | Rodina genů BCL  |
| <b>BCLX</b>            | <i>Apoptosis inhibitor protein</i>                               | Proteinový inhibitor apoptózy                                |
| <b>BRCA1/2</b>         | <i>Breast cancer gene 1/2</i>                                    | Predispoziční geny hereditární formy karcinomu prsu a ovarií |
| <b>Ca125</b>           | <i>Cancer antigen 125</i>  | Nádorový antigen 125   |
| <b>cDNA</b>            | <i>Complementary DNA</i>   | Komplementární DNA   |
| <b>CDX</b>             | <i>Cell line derivated xenografts</i>                            | Xenografty získané z buněčných linií                         |
| <b>CPS1</b>            | <i>Carbamoyl-phosphate synthase 1</i>                            | Karbamoyl-fosfát syntasa 1                                   |
| <b>CTNB1</b>           | <i>Catenin beta-1</i>  | Katenin beta-1   |
| <b>DCIS</b>            | <i>ductal carcinoma in situ</i>                                  | Duktální in situ karcinom                                    |
| <b>EDTA</b>            | <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>                           | Kyselina ethylendiamintetraoctová                            |
| <b>EI2FB1</b>          | <i>Eukaryotic translation initiation factor 2B subunit alpha</i> | Eukaryotický translační iniciační faktor 2B podjednotka alfa |
| <b>EMT</b>             | <i>Epithelial–mesenchymal transition</i>                         | Epiteliálně-mezenchymální tranzice                           |
| <b>ER</b>              | <i>Estrogen receptor</i>   | Estrogenový receptor   |
| <b>FBS</b>             | <i>Fetal bovine serum</i>  | Fetální bovinní sérum  |
| <b>FIGO</b>            | <i>Federation of Gynecology and Obstetrics</i>                   |  |
| <b>He4</b>             | <i>Human epididymis protein-4</i>                                | Lidský epidydimální protein 4                                |
| <b>HER2</b>            | <i>Human epidermal receptor 2</i>                                | Humánní epidermální receptor 2                               |
| <b>HIF</b>             | <i>Hypoxia-induced factor</i>                                    | Transkripční faktor indukovaný hypoxií                       |
| <b>IC<sub>50</sub></b> | Koncentrace způsobující 50% maximální inhibici                   |  |
| <b>IL1</b>             | <i>Interleukin 1</i>   | Interleukin 1  |
| <b>IPO8</b>            | <i>Importin 8</i>  | Importin 8   |
| <b>KRAS</b>            | <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>                | Homolog virového onkogenu krysího sarkomu Kirsten            |
| <b>LCIS</b>            | <i>Lobular carcinoma in situ</i>                                 | Lobulární in situ karcinom                                   |
| <b>lncRNA</b>          | <i>Long noncoding RNA</i>  | Dlouhá nekódující RNA  |
| <b>MDR</b>             | <i>Multidrug resistance</i>                                      | Mnohočetná léková rezistence                                 |
| <b>miRNA</b>           | Malá nekódující RNA  |  |
| <b>MRLP19</b>          | <i>Mitochondrial ribosomal protein L19</i>                       | Mitochondriální ribosomální protein L19                      |
| <b>mRNA</b>            | <i>Messenger RNA</i>   | Mediátorová RNA  |
| <b>MRP3</b>            | <i>Multidrug Resistance Protein 3</i>                            | Protein 3 asociovaný s mnohočetnou lékovou rezistencí        |

|               |   |  |
|---------------|---|--|
| <b>NAG</b>    | N-acetyl-L-glutamát   |  |
| <b>PARP</b>   | <i>Poly-adenozindifosfát-ribózo-polymerázy</i>                                | Poly-adenozindifosfát-ribózo-polymeráza  |
| <b>PCT</b>    | Paclitaxel  |  |
| <b>P-gp</b>   | <i>P-glycoprotein</i>   | P-glykoprotein   |
| <b>PIK3CA</b> | <i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha</i> |  |
| <b>PPIA</b>   | <i>Peptidylprolyl isomerase</i>   | Peptidylprolyl isomerasa   |
| <b>PR</b>     | <i>Progesteron receptor</i>   | Progesteronový receptor  |
| <b>PTEN</b>   | <i>Phosphatase And Tensin Homolog</i>   | Homolog fosfatázy a tensinu  |
| <b>RIP2</b>   | <i>Receptor interacting protein 2</i>   | Protein 2 interagující s receptorem  |
| <b>RISC</b>   | <i>RNA-induced silencing complex</i>  | Ribonukleoproteinový komplex zajišťující RNA interferenci                        |
| <b>SNP</b>    | <i>Single-nucleotide polymorphism</i>   | Jednonukletidové polymorfismy  |
| <b>SPSS</b>   | <i>Statistical package for the social sciences</i>                            |  |
| <b>TBS</b>    | <i>Tris-borate-EDTA (buffer)</i>  | Tris-borát-EDTA pufr   |
| <b>TE</b>     | <i>Tris-EDTA (buffer)</i>   | Tris-EDTA pufr   |
| <b>TGF β</b>  | <i>Transforming growth factor beta</i>  | Transformující růstový faktor beta   |
| <b>TNBC</b>   | <i>Triple negative breast cancer</i>  | Trojitě negativní karcinom prsu  |
| <b>TNF α</b>  | <i>Tumor necrosis factor alfa</i>   | Tumornekrotizující faktor alfa   |
| <b>TNM</b>    | <i>Tumor-node-metastasis</i>  | Klasifikace nádorů dle velikosti, infiltrace lymfatických a přítomnosti metastáz |
| <b>TRIP6</b>  | <i>Thyroid receptor interacting protein 6</i>                                 | Protein 6 interagující s thyroïdním receptorem                                   |
| <b>UBC</b>    | <i>Ubiquitin C</i>  | Ubiquitin C  |
| <b>VEGFR</b>  | <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>                            | Receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor                              |
| <b>YWHAZ</b>  | <i>Tyrosine 3-monooxygenase activation protein ζ</i>                          | Protein zeta aktivující tyrosin 3 monooxygenasu                                  |
| <b>3'UTR</b>  | <i>3' end untranslated region</i>   | Nepřekládaná oblast na 3' konci  |

# 1 Úvod

Nádory zahrnují širokou škálu různorodých onemocnění, jejichž charakteristickým znakem je abnormální a nekontrolovatelný růst buněk vedoucí k útlaku či destrukci okolní tkáně. Na vzniku a následném rozvoji nádoru se podílí celá řada různých faktorů. Právě multifaktoriální etiologie a dlouhodobý vývoj jsou hlavním důvodem, proč obvykle nelze určit přesnou příčinu rozvoje tohoto onemocnění. Nádorová onemocnění patří společně se srdečními a cévními chorobami v dlouhodobém horizontu k nejčastějším příčinám úmrtí v ČR i ve světě.

V oblasti gynekologických malignit je nejzávažnější karcinom ovaria, který bývá často diagnostikován až v pokročilém stadiu onemocnění, kde je již léčba značně limitovaná. V posledních letech je v České republice pozorován také nárůst incidence karcinomu prsu, který souvisí především se zavedením celoplošného screeningu pro včasnou diagnostiku tohoto onemocnění. Odhalení karcinomu prsu v jeho raných stádiích mnohonásobně zvyšuje šanci na úspěšnou léčbu a zároveň vede ke snížení mortality. Přesto však karcinomu prsu ročně podlehnou více než 1600 žen. Terapie karcinomu ovaria a prsu je značně komplikována jejich biologickou heterogenitou, která významně ovlivňuje prognózu a reakci na podanou léčbu. Bezpochyby nejvýznamnější překážkou úspěšné terapie je rozvoj rezistence nádorových buněk vůči podaným cytostatikům vedoucí k progresi onemocnění.

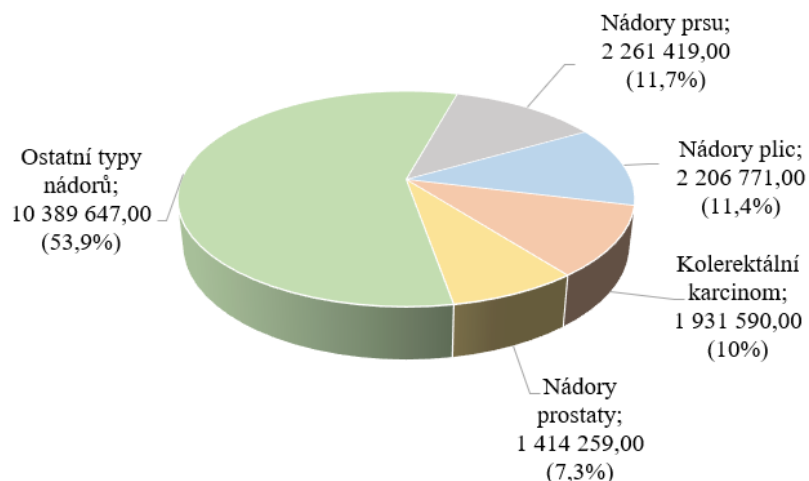
Rozvoj rezistence je podmíněn celou řadou faktorů a různých mechanismů, jež ovlivňují transport léčiva dovnitř a vně buněk, jejich metabolismus, či deregulují buněčné cíle, na které konkrétní protinádorová léčiva působí. Díky této komplexitě je identifikace přesných mechanismů zodpovědných za rezistenci poměrně komplikovaná. Současný výzkum nádorových onemocnění ovšem nabízí identifikaci celé řady potenciálních biomarkerů predikce účinnosti terapie nádorových onemocnění a studuje jejich případnou roli v rozvoji rezistence. Jedněmi z těchto nových molekul s potenciální rolí v rezistenci vůči protinádorovým léčivům, jsou TRIP6, ABCC3 a enzym CPS1, jež hrají důležitou roli v transportu, metabolismu a migraci nádorových buněk.

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na studium genového expresního profilu *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* a jeho změn v kohortách pacientek s karcinomem ovaria a prsu s cílem nalezení vztahu mezi mírou exprese studovaných genů, prognózou onemocnění a predikcí léčebné odpovědi. Odhalení možné úlohy těchto kandidátních molekul v ovlivnění úspěšnosti léčby karcinomu ovaria a prsu by mohlo přispět k jejich využití jako biomarkerů či potenciálních terapeutických cílů pro léčbu nádorových onemocnění. Dále byla studována a porovnávána úloha genů *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* v účinnosti chemoterapeutik taxanů a jejich nových syntetických derivátů v senzitivních a rezistentních nádorových buňkách karcinomu ovaria. Nové taxanové deriváty jsou látky potenciálně využitelné pro terapii nádorů, které jsou rezistentní vůči konvenčním taxanům. Poznání molekulární podstaty působení těchto nových taxanových derivátů, ke kterému práce přispívá, je velmi důležité z hlediska jejich působení a využití v terapii nádorových onemocnění.

## 2 Přehled literatury

### 2.1 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou v současné době druhou nejčastější příčinou úmrtí. V České republice postihnou přibližně každého třetího jedince a každý čtvrtý pak této nemoci podlehně (Dušek *et al.* 2020, Globocan 2020). Jednoznačnou příčinu rozvoje nádorových onemocnění obvykle nelze určit, na jejich vzniku se totiž podílí celá řada faktorů. Mezi ty nejvýznamnější jsou řazeny vnější faktory jako například životní styl (kouření, obezita, stres), expozice kancerogenům či infekce. Neméně důležitou roli hraje i imunitní výbava a genetické predispozice jedince (Todd *et al.* 2017). Incidence jednotlivých typů nádorů ve světě je znázorněna na **Obrázku č. 1**. Celosvětově se nejčastěji vyskytují nádory prsu, plic, prostaty a kolorektální karcinomy (Globocan 2020).

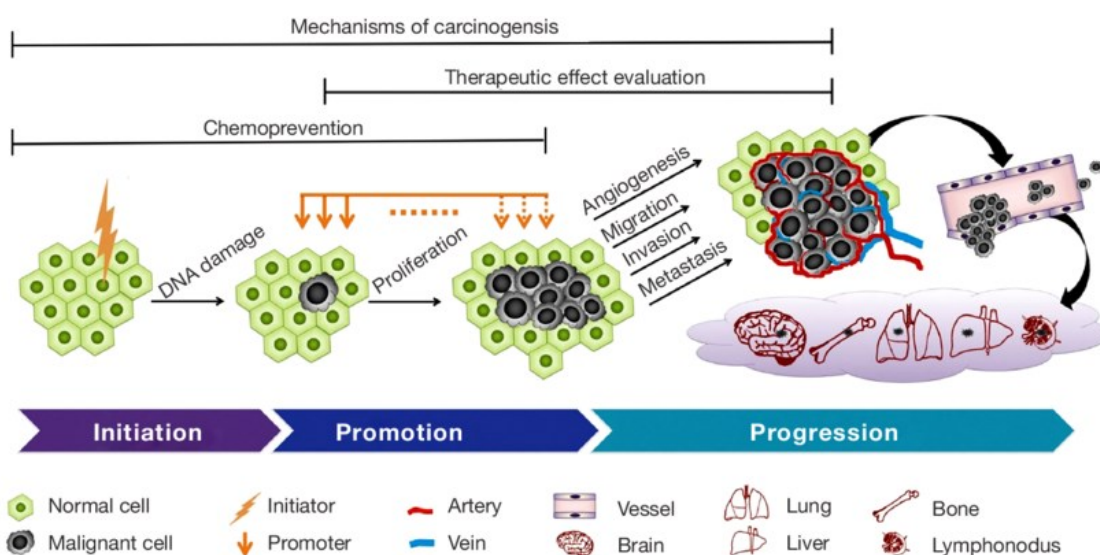


**Obrázek 1: Porovnání jednotlivých typů nádorů ve světě z hlediska jejich incidence**  
Převzato a upraveno dle (Globocan 2020).

Nádorová onemocnění je možné charakterizovat na základě biologických vlastností samotného nádoru. Z toho hlediska je možné nádory rozdělit na benigní a maligní. Obecně platí, že benigní, tedy nezhoubné nádory, bývají opouzdřené, rostou pomaleji a jsou snáze léčitelné, jelikož nemají tendenci tvořit sekundární nádorová ložiska. Oproti tomu nádory maligní, tedy zhoubné, bývají podstatně agresivnější a rychleji rostoucí. Jejich charakteristickým znakem je infiltruující a invazivní růst spolu s tvorbou vzdálených metastáz (Vokurka a Tesařová 2018; Todd *et al.* 2017).

### 2.1.1 Kancerogeneze a typické znaky nádorových buněk

Mechanismus rozvoje nádoru neboli kancerogeneze je vícestupňový proces, který je ovlivněn celou řadou vnitřních a vnějších faktorů. Na molekulární úrovni je kancerogeneze spuštěna mutací protoonkogenů, jež nesou informaci o buněčném dělení a růstu, či tumor supresorových genů, které tlumí buněčný růst a podporují programovanou buněčnou smrt, nebo DNA reparačních genů, jež se podílejí na opravách mutací v DNA (Motofei 2018; Todd et al. 2017). Mutace v těchto genech lze rozlišit na vrozené, tedy geneticky podmíněné, a na mutace získané, které mohou vznikat spontánně nebo na základě působení kancerogenů (Vokurka a Tesařová 2018). Schéma kancerogeneze je popsáno na **Obrázku č. 2**.



**Obrázek 2: Vícestupňový proces kancerogeneze.**

V rámci iniciace dochází k prvotnímu poškození DNA, jež může vést k nekontrolovatelné proliferaci. Tato abnormální proliferace může být stimulována působením promotorů, které však samy o sobě vznik nádorů nevyvolají, pouze ho podpoří. Výsledkem těchto procesů je nádor, jenž adaptací na okolní podmínky a součinností s mikroprostředím může podléhat další progresi. Převzato z (Liu et al. 2015).

Během vícestupňového procesu kancerogeneze dochází k formování typických vlastností nádorových buněk (Hanahan a Weinberg 2011; 2000). Jednou ze základních charakteristik je porucha regulace celé řady signálů, které vedou ke zvýšené proliferaci a zároveň podporují autonomii nádorových buněk. Nadměrná proliferace souvisí také s poruchou regulace buněčného cyklu, která je způsobena mutací v tumorsupresorových genech (především *TP53*). Tyto změny spolu s nepřítomností regulačních signálů umožňují nádorovým buňkám prostupovat buněčným cyklem rychleji, což vede k indukci genomové nestability. Buňky s nestabilním genomem jsou pak náchylnější ke vzniku

mutací a dochází tak k akumulaci různých mutantních fenotypů, které nádorovým buňkám mohou poskytovat různé prorůstové výhody (*Calota et al. 2019; Motofei 2018*).

Se zvýšeným proliferačním potenciálem souvisí ztráta Hayflickova limitu v důsledku aktivace telomerázy či alternativních mechanismů prodlužujících telomery. Tato replikační nesmrtelnost je podpořena mutacemi v již zmíněných tumorsupresorových genech a také rezistencí nádorových buněk vůči programované buněčné smrti. Tato rezistence vede k akumulaci různě poškozených nádorových buněk, které postupně mohou získat celou řadu výhodných vlastností (*Calota et al. 2019; Bertolaso a Dieli 2017*).

Dalším důležitým znakem nádorových buněk je zvýšená produkce laktátu vedoucí k inhibici cytotoxických T lymfocytů, a tudíž k zajištění jisté ochrany před destrukcí imunitním systémem. Přestože se nádorové buňky snaží imunitnímu systému uniknout, zároveň vyžadují jeho součinnost při indukci zánětu, který podporuje nádorovou progresi. Nicméně samotné zánětlivé prostředí je pro nádorovou progresi nedostačující. Nádorové buňky, stejně tak jako buňky zdravé tkáně, vyžadují dostatečný přísun živin, kyslíku a dalších stimulačních faktorů. V případě nedostatečného přísunu kyslíku dochází vlivem hypoxie ke spuštění angiogeneze a tvorby nových cév, jež významně podporuje invazivitu a metastázování. (*Fouad a Aanei 2017; Hanahan a Weinberg 2011*).

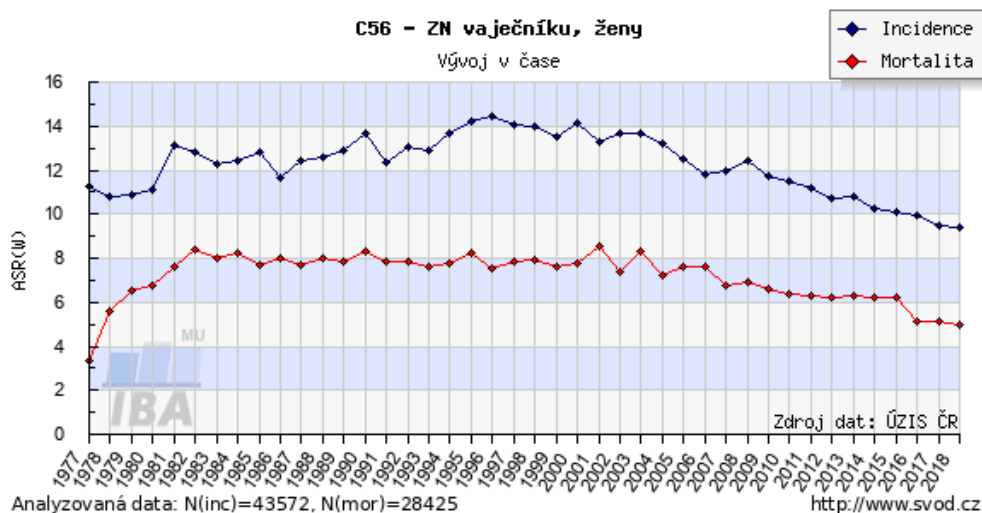
Přestože většina nádoru vzniká sporadicky, pro některé malignity je typická přítomnost vrozené mutace. Tyto nádory vznikající na podkladě genetické predispozice se označují jako hereditární nádorové syndromy a zaujímají zhruba 5–10 % ze všech případů nádorových onemocnění. Pro hereditární nádorové syndromy jsou typické vrozené mutace v DNA reparačních či tumorsupresorových genech, které mnohonásobně zvyšují riziko rozvoje nádoru ve srovnání s jedinci bez vrozené mutace. Obecně platí, že tyto syndromy bývají heterogenního charakteru. Proto se i u jedinců se stejnou mutací často vyskytují odlišné fenotypové projevy (*Samadder et al. 2019; Yamauchi a Takei 2018*).



Mezi nejznámější hereditární nádorové syndromy je řazena dědičná forma karcinomu prsu a ovarií, která je nejčastěji asociovaná se zárodečnou mutací v tumorsupresorových genech *BRCA1* (breast cancer susceptibility gene 1) či *BRCA2* (breast cancer susceptibility gene 2). Nositelé těchto mutací mají přibližně 10ti násobně vyšší riziko rozvoje karcinomu prsu či ovarií (*Samadder et al. 2019; Kuchenbaecker et al. 2017*). Dědičná forma karcinomu prsu a ovarií bývá spojována i s jinými predispozičními geny. Mezi ty nejvýznamnější patří mutace v *PALB2*, *ATM* a *CHEK2*, které hrají důležitou roli v procesech DNA reparace (*Piombino et al. 2020; Kurian et al. 2017*). Dalším zástupcem hereditárních nádorových onemocnění je Lynchův syndrom, jenž je spojen se zárodečnou mutací v genech účastnících se DNA Mismatch repair (MMR geny). Typicky se jedná o mutace v *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, či *PMS2*, které zvyšují riziko rozvoje různých typů nádorů. Nejčastěji kolorektálního či endometriálního karcinomu (*Biller et al. 2019*). Mezi významné zástupce je řazen také Li-Fraumeni syndrom, který je však poměrně vzácný. Jedná se o nádorové onemocnění s autozomálně dominantní dědičností a s celou řadou heterogenních projevů. Li-Fraumeni syndrom je podmíněn mutací v *TP53*, jež vede ke ztrátě funkce tohoto tumorsupresorového genu. Právě proto je i tento nádorový syndrom asociován s celoživotním rizikem rozvoje různých typů nádorů. Nejčastěji se jedná o sarkomy, karcinomy prsu a také různé typy leukémií (*Gargallo et al. 2020; Vogel 2017*).

## 2.2 Ovariální karcinomy, jejich diagnostika a klasifikace

Karcinomy ovarií tvoří zhruba čtvrtinu všech gynekologických malignit. Jedná se o skupinu velmi heterogenních nádorů s poměrně vysokou mortalitou, která souvisí s pozdní diagnózou. Více než 75 % případů bývá totiž diagnostikováno až v pokročilém stádiu. Ovariální karcinomy nejčastěji postihují starší ženy, obvykle ve věku 50–75 let. V České republice ročně postihnou zhruba 1000 žen, nicméně v posledních letech je u nádorů ovarií pozorován pokles jak incidence, tak i mortality (*Dušek et al. 2020; Vokurka a Tesařová 2018*). Vývoj hrubé incidence a mortality karcinomu prsu v České republice popisuje **Obrázek č. 3**.



**Obrázek 3: Incidence a mortalita karcinomu ovarií.** Vývoj hrubé incidence (na 100 000 osob) a mortality (na 100 000 osob) na území ČR během let 1977–2018. Převzato z ÚZIS ČR.

Vzhledem k heterogenní povaze ovariálního karcinomu je obtížné přesné určení příčiny rozvoje. Předpokládá se, že kromě věku hraje významnou roli také hladina estrogenů, které spolu s dalšími hormony ovlivňují průběh menstruačního cyklu a ovulaci. Každá ovulace sama o sobě představuje riziko, jelikož dochází k narušení povrchové vrstvy ovariálního epitelu a následně k jeho obnově. Proto vyšší hladina estrogenů a zvýšená četnost ovulací (typicky brzká první menstruace a pozdní menopauza) bývá spojována s vyšším rizikem rozvoje ovariálního karcinomu (*Stewart et al. 2019; Mallen et al. 2018*).

Naopak užívání hormonální antikoncepce, která navozuje anovulační cyklus, toto riziko významně minimalizuje. Stejný protektivní vliv byl potvrzen také u těhotenství a laktace (*Stewart et al. 2019; Chien a Poole 2017*). Důležitým rizikovým faktorem rozvoje ovariálního karcinomu je přítomnost vrozené mutace v genech účastnících se DNA reparace. Nejčastěji se jedná o mutace v genech *BRCA1* či *BRCA2*, které zaujímají kolem 15% všech případů (*Amin et al. 2020*). Významné jsou i mutace např. v *TP53*, *RAD51*, *CHEK2*, *ATM* a genech Mismatch repair, které se však nevyskytují tak často a jsou typické spíše pro familiární karcinom ovarií (*Flaum et al. 2020*).

Diagnostika ovariálních karcinomů je značně komplikována již zmíněnou heterogenitou a především řadou nespecifických příznaků, které zároveň znesnadňují zavedení efektivního screeningu pro včasné odhalení tohoto onemocnění (*Stewart et al. 2019*). Stanovení diagnózy lze provést na podkladě komplexního gynekologického vyšetření včetně transvaginální sonografie a stanovení tumorových markerů Ca125 a HE4, které sice nejsou pro potvrzení diagnózy dostatečně specifické, ale jsou vhodné pro monitorování odpovědi na léčbu a také k odhadu prognózy (*Dochez et al. 2019*).

Zmíněné tumorové markery se také využívají pro kvantifikaci rizika rozvoje ovariálního karcinomu pomocí ROMA algoritmu (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm), jež kombinuje věk ženy a přítomnost či nepřítomnost menopauzy spolu s hladinou Ca125 a HE4 v séru (Dochez et al. 2019; Zhang et al. 2019). Na obdobném principu je založen také algoritmus RIM (Risk of Malignancy index), který na základě kombinace hladiny Ca125 v séru, ultrazvukového vyšetření a přítomnosti či nepřítomnosti menopauzy odhaduje riziko malignity novotvaru (Dochez et al. 2019).

Pro zvolení vhodné léčby je nutné provést biopsii a určit, ze kterých buněk nádor vychází. Zhoubné nádory ovarií lze dle původu a biologických vlastností rozdělit do čtyř kategorií: *epiteliální tumory*, *geminální tumory*, *gonadostromální tumory* a *sekundární tumory*, jak je popsáno v **Tabulce č. 1** (Gaona-Luviano et al. 2020). Právě nádory ovariálního epitelu jsou nejčastější, a tím pádem i klinicky nejvýznamnější. Jedná se o relativně pomalu rostoucí nádory, které mají sklony k tvorbě implantačních metastáz na peritoneu. Zároveň mohou metastázovat do spádových uzlin (pánevní, mediastinální, nadklíčkové) a skrz hematogenní cestu také do jater či do plic (Berek et al. 2018; Kurman a Shih 2016).

**Tabulka 1: Histologická klasifikace ovariálních karcinomů.** Upraveno dle (Luviano et al. 2020).

| Histologická skupina             | Histologický subtyp  |
|----------------------------------|--|
| <b><i>Epiteliální nádory</i></b> | serózní (low grade, high grade)  |
|                                  | mucinózní  |
|                                  | endometrioidní   |
|                                  | ze světlých buněk (clear cell karcinom)  |
|                                  | nádory smíšené   |
| <b><i>Stromální nádory</i></b>   | granulózní tumory  |
|                                  | arhenoblastom (nádor z Leydigových a Sertoliho buněk)  |
|                                  | jiné vzácnější mezodermální nádory ovaria  |
| <b><i>Germinální nádory</i></b>  | dysgerminom  |
|                                  | non-dysgerminomy z extraembryonálních tkání (nádor ze žloutkového váčku, nádory z trofoblastu, choriokarcinom) |
|                                  | z embryonálních tkání (teratom)  |

Epiteliální nádory ovarií lze charakterizovat i dle stupně diferenciaci na tumory typu I, mezi které patří převážně low grade tumory, a na tumory typu II, kam řadíme high grade serózní karcinom, maligní smíšený tumor, primární peritoneální karcinom a nediferencovaný karcinom. Tumory typu I vznikají obvykle na podkladě benigních lézí. Mezi typické mutace low grade tumorů jsou řazeny především mutace *KRAS*, *BRAF*, *PTEN*, *PIK3CA*, *CTNNB1* (Kurman a Shih 2016; Levine 2013). High grade tumory bývají typické nejen rychlým růstem a pozdní diagnostikou, ale i také lokalizací. Většina těchto nádorů totiž vzniká přímo ve vejcovodu. K charakteristickým mutacím u těchto nádorů patří mutace v *TP53*, *BRCA1* a *BRCA2* (Kurman a Shih 2016; Zikán 2016).

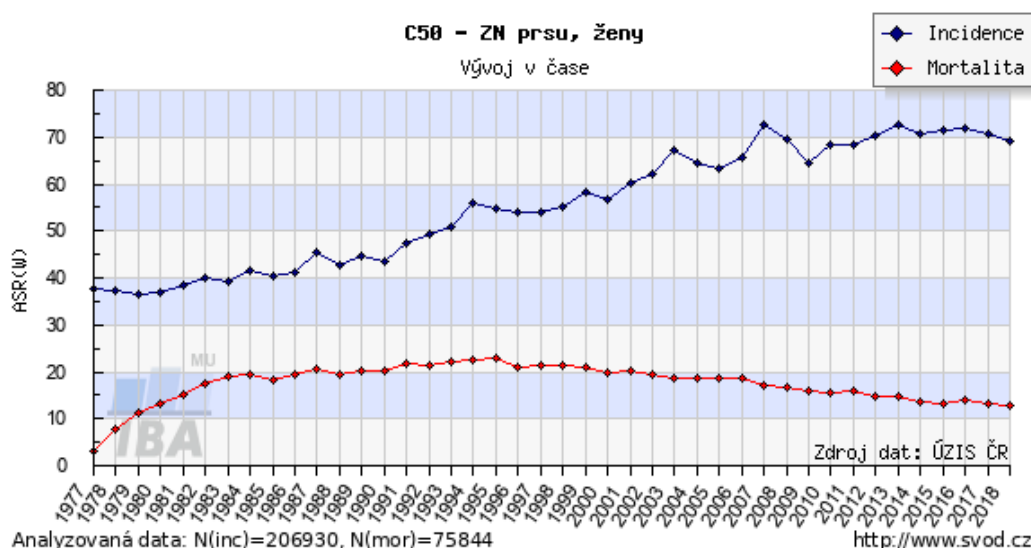
Pro přesné určení rozsahu ovariálního karcinomu lze využít klasický TNM systém, nicméně častěji se využívá tzv. FIGO klasifikace, která rozděluje nádory ovarií do 4 stádií popsaných v **Tabulce č. 2** (Gaona-Luviano et al. 2020; Prat 2015). Přesná charakterizace nádoru na základě dle FIGO klasifikace je důležitá pro zvolení optimální léčby a snazší stanovení prognózy (Gaona-Luviano et al. 2020; Todd et al. 2017).

**Tabulka 2: Porovnání FIGO a TNM klasifikace ovariálních karcinomů.**  
Upraveno dle (Gaona-Luviano et al. 2020; Prat 2015)

| FIGO stádium | TNM klasifikace | Charakteristika nádoru  |
|--------------|-----------------|---|
| <b>I</b>     | T1,N0, M0       | na vaječníku  |
| <b>IA</b>    |                 | na jednom vaječníku, bez přítomnosti metastáz   |
| <b>IB</b>    |                 | na obou vaječnících, bez přítomnosti metastáz   |
| <b>IC</b>    |                 | na jednom či obou vaječnících:<br>s přítomností maligních buněk v ascitu či peritoneálním výplachu či s rupturou pouzdra nádoru |
| <b>II</b>    | T2, N0, M0      | na jednom či obou vaječnících s metastázemi v pánvi či peritoneu  |
| <b>IIA</b>   |                 | šíření tumoru do dělohy či na vejcovody   |
| <b>IIB</b>   |                 | šíření tumoru do měkkých tkání v pánvi  |
| <b>III</b>   | T1/ T2, N1, M0  | na jednom či obou vaječnících s metastázemi v peritoneu/ pánvi/ retroperitoneálních lymfatických uzlinách                       |
| <b>IIIA</b>  |                 | přítomnost mikroskopických metastáz v peritoneu/pánvi/ retroperitoneálních lymfatických uzlinách                                |
| <b>IIIB</b>  |                 | přítomnost makroskopických metastáz v peritoneu/pánvi/ retroperitoneálních lymfatických uzlinách (do 2 cm)                      |
| <b>IIIC</b>  |                 | přítomnost makroskopických metastáz v peritoneu/pánvi/ retroperitoneálních lymfatických uzlinách (nad 2 cm)                     |
| <b>IV</b>    | T3, N0/ N1, M1  | přítomnost vzdálených metastáz  |
| <b>IVA</b>   |                 | přítomnost pleurálního výpotku s pozitivní cytologií  |
| <b>IVB</b>   |                 | přítomnost parenchymálních metastáz a vzdálených metastáz mimo břišní dutinu  |

## 2.3 Karcinomy prsu, jejich diagnostika a klasifikace

Zhoubné nádory prsu jsou nejčastějším nádorovým onemocněním žen, nejen v České republice, ale i v ostatních zemích světa. Hned po karcinomech plic jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí žen na nádorová onemocnění (Dušek *et al.* 2020; Januškevičienė a Petrikaitė 2019). Incidence karcinomu prsu celosvětově narůstá. Ročně je diagnostikován u více než 2 milionů jedinců a zaujímá tak téměř jednu čtvrtinu všech zhoubných onemocnění u žen (Dušek *et al.* 2020; Globocan 2020). Z **Obrázku č. 4** je patrné, že během posledních let byl v České republice zaznamenán nárůst incidence spolu s neměnným trendem mortality. Tyto data jsou odrazem vyspělých diagnostických možností, pokroků v léčbě a především zavedení celoplošného screeningu pro včasné odhalení tohoto onemocnění (Tomášek 2015).

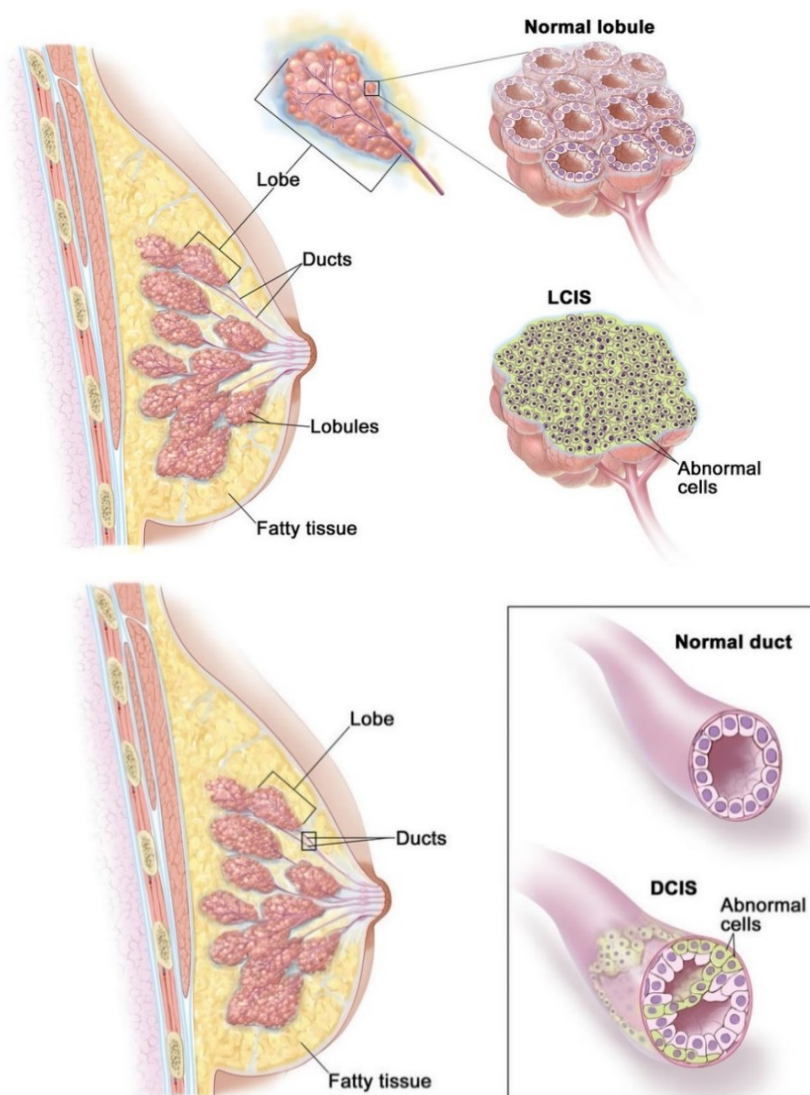


**Obrázek 4: Incidence a mortalita karcinomu prsu.** Vývoj hrubé incidence (na 100 000 osob) a mortality (na 100 000 osob) na území ČR během let 1977–2018. Převzato z ÚZIS ČR.

Z biologického hlediska jsou karcinomy prsu řazeny mezi heterogenní skupinu nádorů s výrazně odlišnou prognózou. Předběžná diagnostika se zakládá na mamografickém a sonografickém vyšetření prsou, která se v rámci celoplošného screeningu v ČR provádí u všech žen starších 45let 2x ročně (Abrahámová 2019; Vokurka a Tesařová 2018). Přesné potvrzení diagnózy je možné provést až po biopsii a histologickém vyšetření vzorku nádorové tkáně (Ryan *et al.* 2017).

Prsní karcinomy lze klasifikovat na neinvazivní a invazivní dle jejich schopnosti zakládat sekundární dceřiná ložiska. Typickým zástupcem první skupiny je duktální karcinom in situ (DCIS), který pochází z maligně změněných epitelových buněk vývodů, a také lobulární karcinom in situ (LCIS), vycházející z epitelových lalůček (Tsang a Tse

2020; West et al. 2017). Porovnání těchto dvou typů prsních karcinomů je znázorněno na **Obrázku č. 5**. Mezi invazivní karcinomy řadíme invazivní lobulární karcinom a invazivní duktální karcinom, který zaujímá zhruba 70 % všech případů prsního karcinomu (Tsang a Tse 2020).



**Obrázek 5:** Porovnání lokalizace duktálního (vlevo) a lobulárního karcinomu (vpravo).  
Převzato z (Winslow 2012).

Dalším kritériem využívaným pro klasifikaci prsních karcinomů je jejich expresní profil, kdy se stanovuje hladina receptorů pro estrogen (ER) a progesteron (PR), exprese *HER2* (Human epidermal receptor 2) a také samotná míra proliferace nádoru (*Tsang a Tse 2020; Drăgănescu a Carmocan 2017*). Stanovení exprese *HER2* je významné pro určení prognózy. Tento receptor totiž hraje klíčovou roli v regulaci buněčné proliferace a růstu. Proto je zvýšená exprese tohoto markeru spojována s nepříznivou prognózou nejen u karcinomu prsu (*Albagoush a Limaiem 2021*). Míra proliferace nádoru je nejčastěji stanovena na základě mitotického indexu v kombinaci s imunohistochemickou detekcí proliferačního markeru Ki-67. Zvýšená exprese tohoto markeru je totiž typická výhradně pro proliferující buňky v pozdní G1 až M fázi buněčného cyklu (*Mehta et al. 2019; Sun a Kaufman 2018*). Zhodnocení expresního profilu v kombinaci s TNM klasifikací je klíčovým parametrem pro volbu optimální léčby (*Tsang a Tse 2020*). V současné době se rozlišuje 5 molekulárních podtypů prsních karcinomů (*Upraveno dle Tsang a Tse 2020; Tomášek 2015*):

- Luminální A: *ER a PR pozitivní ( $\geq 20\%$ ), HER2 negativní, nízká proliferace.*
- Luminální B HER2 negativní: *ER pozitivní, HER2 negativní a nejméně jeden z následujících znaků: vysoká proliferace, negativní nebo nízké ( $< 20\%$ ) PR.*
- Luminální B HER2 pozitivní: *ER pozitivní, HER2 pozitivní, jakákoliv proliferace, jakékoliv PR.*
- HER2 (neluminální): *ER i PR negativní, HER2 pozitivní.*
- Trojitě negativní: *ER i PR negativní, HER2 negativní.*

Po potvrzení diagnózy a určení typu nádoru je nutné stanovit jeho rozsah a samotné stádium nemoci. Pro určení rozsahu nádoru se nejčastěji využívá TNM klasifikace, kde T popisuje velikost primárního nádoru, M přítomnost či nepřítomnost vzdálených metastáz a N zasažení spádových lymfatických uzlin. TNM klasifikaci je možné přiřadit k jednotlivým stádiím onemocnění, jak je popsáno v **Tabulce č. 3**. Přesné určení stádia nemoci spolu s TNM klasifikací napomáhají ke zvolení optimální léčby a posouzení její úspěšnosti, ale také usnadňují odhad prognózy (*Abrahámová 2019; Todd et al. 2017*).

**Tabulka 3: TNM klasifikace a stádia nemoci.** Upraveno dle (*Abrahámová 2019; Todd et al. 2017*)

| Stádium nemoci | Klasifikace TNM                       |
|----------------|---------------------------------------|
| I              | T1, N0, M0                            |
| IIA            | T1, N1<br>T2, N0                      |
| IIB            | T2, N1<br>T3, N0                      |
| IIIA           | T1, N2/ N3<br>T2, N2/ N3<br>T3, N2–N3 |
| IIIB           | T4, N2–N3                             |
| IIIC           | T4, N3                                |
| IV             | T4, M1                                |

## 2.4 Terapeutické možnosti nádorových onemocnění

Obecně lze léčebné postupy využívané u nádorových onemocnění rozdělit na kurativní a nekurativní. Cílem kurativních léčebných postupů je úplné vyléčení pacienta díky eliminaci všech nádorových buněk. Oproti tomu nekurativní postupy nepředpokládají plné uzdravení pacienta. Jejich cílem je alespoň částečná eliminace nádorových buněk či potlačení symptomů onemocnění a zmírnění nežádoucích účinků spojených s terapií. Součástí nekurativních léčebných postupů bývá paliativní léčba, která zahrnuje převážně zmíněnou podpůrnou léčbu s cílem zkvalitnění života pacientů s terminálním stádiem onkologického onemocnění (*Gärtner et al. 2018; Vorlíček et al. 2012*).

Zpravidla je léčba nádorových onemocnění komplexní a zahrnuje kombinaci různých přístupů jako je chirurgické odstranění nádoru, chemoterapie, radiační terapie, hormonální terapie a v současné době také imunoterapie a cílená terapie. Zatímco chirurgický zákrok a radioterapie postihují konkrétní místa a části lidského těla, chemoterapie zpravidla ovlivňuje celý organismus. Základní podstatou klasické chemoterapie je zabití a eliminace růstu nádorových buněk podáním chemoterapeutika (cytostatika) či jejich kombinací. Dle mechanismu působení lze rozdělit chemoterapeutika na antimetabolity, alkylační látky, protinádorová antibiotika, interkalační látky, inhibitory topoizomeráz, inhibitory reparace DNA a mitotické jedy (*Chu a DeVita 2021; Mollaei et al. 2021*).



Významným problémem spojeným s podáváním chemoterapie je jednak celá řada vedlejších účinků, které negativně ovlivňují kvalitu života pacienta a zároveň znesnadňují celý léčebný proces a také rozdílná účinnost chemoterapeutické léčby, jež závisí na vlastnostech nádoru, dávkování a také na typu použitých cytostatik (*Nurgali et al. 2018; Mahdavi et al. 2020*). Nicméně u některých nádorů může být léčba cytostatiky zcela neúčinná, a to z důvodu rozvoje rezistence, která se může objevit již při prvním podání cytostatik, anebo si ji mohou buňky nádoru postupně vybudovat (*Ji et al. 2019; Zheng 2017*). Vznik rezistence souvisí se změnou farmakokinetiky a cytokinetiky buněčné populace a zároveň s metabolickými a funkčními změnami na úrovni buňky (*Ji et al. 2019; Nikolaou et al. 2018*). Právě rozvoj chemorezistence představuje zásadní problém v úspěšnosti protinádorové léčby.

Dalším možným terapeutickým přístupem systémové léčby je imunoterapie zahrnující postupy stimulující buněčnou protinádorovou imunitu interakcí s nádorovými antigeny (*Velcheti a Schalper 2016*). Systémovou léčbou je také cílená terapie využívající látky, které v nádorových buňkách interferují s konkrétními signálními dráhami či proteiny a blokují tak pochody uvnitř buněk (*Baudino 2015; Kumar et al. 2012; Klener 2011*). Nejčastěji se jedná o monoklonální protilátky, např. Bevacizumab, inhibitory malých molekul či antiangiogenní látky jako tyrosinkinázové či VEGFR inhibitory (*Liu et al. 2021; As et al. 2021; Baudino 2015*).

V poslední době existuje snaha nastavovat optimální terapeutické režimy testováním biomarkerů a nádorových markerů podle tzv. „precizní onkologie“, která na základě molekulární a histologicky-specifické charakterizace jednotlivých nádorů umožňuje optimální nastavení terapie spíše než nespecifické podání cytostatik. Na podkladě v současnosti dostupných metod tzv. sekvenování nové generace a dostupnosti genomických dat v jejich databázích získáváme řadu informací pro optimalizaci a individualizaci terapeutických režimů nádorových onemocnění (*Lassen et al. 2021; Dugger et al. 2018*). Stejně tak využití precizní onkologie může vést k větší úspěšnosti léčby rezistentních forem nádorových onemocnění. Identifikace klíčových genetických variant a biomarkerů ovlivňujících individuální léčebnou odpověď je jednou ze zásadních výzev pro zlepšení terapeutických možností nádorových onemocnění.

## 2.4.1 Terapie karcinomu prsu a ovaria

Terapie karcinomů prsu a ovaria v současnosti představuje nejčastěji kombinaci chirurgického zákroku, radioterapie, klasické chemoterapie a cílené terapie. V časové ose se chemoterapie ještě dělí na neoadjuvantní a adjuvantní. Neoadjuvantní terapie se podává před chirurgickým odstraněním nádoru a jejím cílem je zpravidla zmenšení a zajištění operability nádorové masy. Adjuvantní terapie je podávána po základní léčebné metodě (chirurgický zákrok, radioterapie) k odstranění mikroskopických zbytků choroby či případných mikrometastáz. V případě selhání těchto typů léčby je volena paliativní podpůrná léčba finálních stadií onemocnění. Použití konkrétního typu terapie se odvíjí od histo-patologického vyšetření vzorku nádorové tkáně, rozsahu onemocnění a stanovení genetického profilu pacientek (*Colombo et al. 2021; Cardoso et al. 2020; Lee et al. 2020a; Abrahámová 2019; Stewart et al. 2019; Klener a Klener jr. 2013*). Na základě těchto výsledků je pak zvolena optimální léčba, jejímž cílem je buď odstranění nádoru či jeho zmenšení. V případě karcinomu prsu se jeví jako nejvhodnější léčebný postup chirurgické odstranění nádoru spolu se spádovými lymfatickými uzlinami, ev. provedení mastektomie, které bývá doprovázeno adjuvatní systémovou léčbou. (*Stewart et al. 2019*).

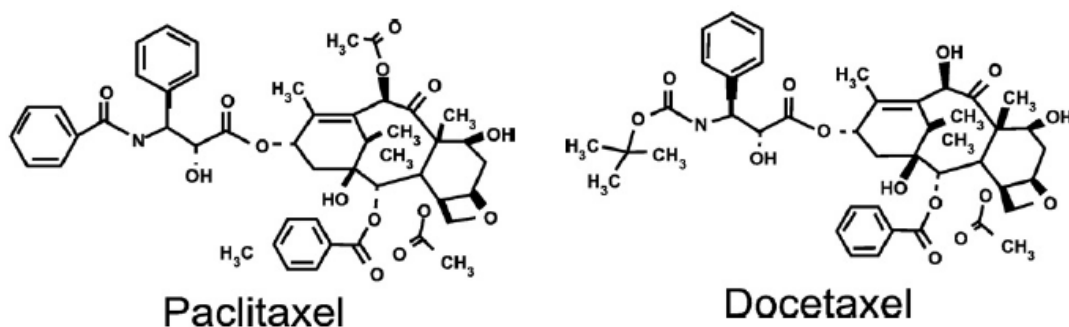
Při léčbě karcinomu prsu jsou mezi klasická chemoterapeutika první volby řazeny antracykliny a taxany. V závislosti na hormonálním profilu pacientek se pak volí kombinace s hormonální terapií. U nádorů s aktivními hormonálními receptory (ER, PR) lze kromě klasické chemoterapie využít i hormonální léčbu, jenž je založena na inhibici interakce mezi estrogeny a jejich signalizacemi, které stimulují růst nádoru (*Drăgănescu a Carmocan 2017*). V rámci hormonální terapie jsou rozlišovány dva základní přístupy. Prvním z nich je zamezení produkce estrogenů spočívající v odstranění zdroje příslušných hormonů (obvykle odstranění ovarií či inhibitory aromatáz). Druhou možností je inhibice působení estrogenů, které je založeno buď na přímé blokaci tvorby těchto hormonů či na jejich kompetici se selektivním modulátorem pro estrogenový receptor (*Abrahámová 2019; Drăgănescu a Carmocan 2017*).

U pacientek s karcinomem prsu je dále významné stanovení exprese HER2 receptoru (human epidermal growth factor receptor 2). Nadměrná exprese tohoto receptoru je zodpovědná za 15–30 % invazivních karcinomů prsu a je silně asociována se špatnou prognózou a přežíváním. V případě HER2 pozitivity jsou v terapii využívány HER2 inhibitory přehledně shrnuté v práci *Ishikawa a kol (2014)*. Skupinou s nejhorší prognózou jsou u karcinomu prsu tzv. trojitě negativní pacientky (Triple negative breast cancer patients; TNBC patients) s negativní expresí jak ER a PR receptorů, tak HER2 receptoru. U těchto pacientek se v terapii využívá zejména klasické chemoterapie pomocí antracyklinů a taxanů. U pacientek s rozvinutým metastatickým TNBC či HER2 pozitivním nádorem jsou v terapii využívány i preparáty cílené terapie nejčastěji bevacizumab (*Bartsch 2021; Cardoso et al. 2020; Lee et al. 2020a*). V léčbě karcinomu prsu je rovněž významné určení, zda je pacientka *BRCA1/2* mutovaná či nikoliv. V případě zárodečné mutace *BRCA1/2* genů je v léčbě využívána rovněž kombinace s PARP inhibitory (preparát Olaparib), které blokují enzymy účastnící se DNA reparační (*Caulfield et al. 2019; Vlasák et al. 2018; Lee et al. 2020a*).

Při léčbě ovariálních karcinomů jde rovněž o komplexní léčbu kombinující chirurgické odstranění nádoru, chemoterapii, radioterapii a cílenou terapii. Zpravidla je u brzkých stadií využíván chirurgický zákrok následovaný adjuvantní chemoterapií. V případě rozvinutého onemocnění stadia III–IV je nejprve použita neoadjuvantní chemoterapie následovaná chirurgickým zákrokem s pokračující adjuvantní terapií. Z chemoterapeutik se využívají taxany obvykle však v kombinaci s deriváty platiny (cisplatina, karboplatina), které vytvářejí adukty na DNA (*Colombo et al. 2021; Vlasák et al. 2018*). U pacientek s rozvinutým onemocněním stadia IV a špatnou prognózou je přidáván v terapii bevacizumab z cílených preparátů a u pacientek s *BRCA1/2* zárodečnými nebo somatickými mutacemi jsou doporučovány PARP inhibitory (*Colombo et al. 2021; Ledermann a Pujade-Lauraine 2019; Vlasák et al. 2018*).

## 2.5 Využití taxanů v protinádorové terapii

Jak již bylo zmíněno, v terapii karcinomu ovaria i prsu jsou využívány taxanová cytostatika. Jedná se o cytostatika přírodního původu získané z rostlin čeledi tisoovitých, které představují významnou skupinu chemoterapeutik využívaných nejen při léčbě solidních nádorů prsu a ovarií, ale také u nádorů plic, pankreatu a prostaty. Protinádorový účinek byl prokázán u paclitaxelu (*Taxol*) extrahovaného z kůry Tisu mořského (*Taxus brevifolia*) a také u docetaxelu (*Taxotere*), který byl získán z jehličí Tisu červeného (*Taxus bacata*). Chemická struktura těchto dvou taxanů je znázorněna na **Obrázku č. 6**. Mezi zástupce taxanů jsou řazeny i čistě synteticky připravené deriváty (označované jako taxoidy), ke kterým řadíme larotaxel a ortataxel (*Abrahámová 2019; Klener a Klener jr. 2013*).



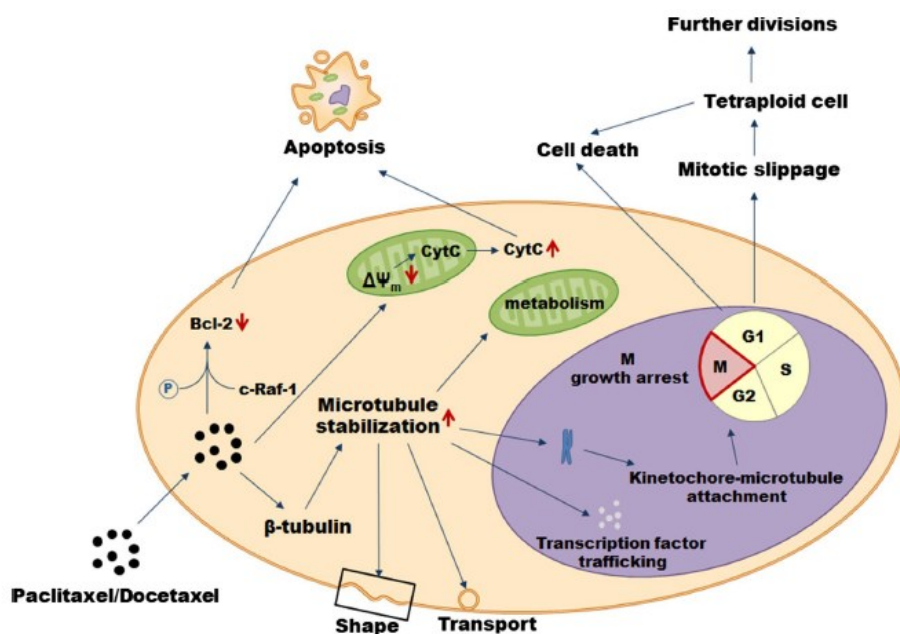
**Obrázek 6: Chemická struktura Paclitaxelu a Docetaxelu.** Převzato z (*McGrogan et al. 2008*).

### 2.5.1 Mechanismus účinku

Taxany se svým mechanismem účinku řadí mezi tzv. mitotické jedy. Cílovou buněčnou strukturou jsou mikrotubuly, které se účastní řady důležitých procesů. Zajišťují správnou segregaci chromozomů v mitóze, buněčnou signalizaci a motilitu, jsou součástí cytoskeletu a podílejí se na buněčném růstu, pohybu a dělení (*Mikuła-Pietrasik et al. 2019; Goodson a Jonasson 2018*). Základní stavební jednotkou mikrotubulů je protein tubulin sestávající z  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek. Tyto podjednotky jsou střídavě uspořádány do protofilament, 13 protofilament pak tvoří stěnu jednoho mikrotubulu. Specifické uspořádání protofilament určuje polaritu mikrotubulů, kdy rychle rostoucí (+) konec má volný  $\beta$  tubulin a pomalu rostoucí (–) konec je tvořen  $\alpha$  tubulinem (*Goodson a Jonasson 2018*).

Hlavní mechanismus působení taxanů spočívá v ovlivnění dynamické nestability mikrotubulů, jež je zásadní nejen pro jejich správné fungování, ale i pro adaptaci na různé podmínky. Při narušení rovnováhy mezi polymerací na (+) konci a disociací na (–) konci dochází ke změně struktury mikrotubulů, která obvykle negativně ovlivňuje jejich funkci v buněčných procesech (Goodson a Jonasson 2018). Klasické taxany a ostatní taxanové deriváty se váží přímo na  $\beta$  podjednotky na N-terminálním konci mikrotubulů a indukují tak stabilizaci mikrotubulů. Výsledkem je zástava buněčného cyklu nádorových buněk v metafázi v důsledku přítomnosti bipolárního dělicího vřeténka. Zároveň dochází aktivaci kontrolních bodů, jež zabráňují dalšímu průchodu buněčným cyklem (Mikula-Pietrasik et al. 2019; Weaver 2014).

Kromě stabilizace mikrotubulů mohou taxany navodit buněčnou smrt i dalšími mechanismy. Prvním z nich je snížení intracelulárního membránového potenciálu mitochondrií vedoucí k otevření membránových pórů a uvolnění cytochromu C spolu s pro-apoptotickými faktory. Zvýšená hladina pro-apoptotických faktorů spouští aktivaci kaspáz, které se aktivně podílejí na realizaci apoptózy. Jiným možným mechanismem je fosforylace anti-apoptického proteinu Bcl-2, která vede k jeho inaktivaci a ke zvýšené frekvenci apoptózy (Mikula-Pietrasik et al. 2019; Ferlini et al. 2009). Přehledné shrnutí mechanismů působení klasických taxanů je znázorněno na **Obrázku č. 7**.



**Obrázek 7: Mechanismus působení klasických taxanů.**

Hlavní cílovou strukturou taxanů jsou mikrotubuly, které jsou stabilizovány. Tato stabilizace má negativní vliv na tvar buňky a její metabolismus, zároveň dochází k narušení buněčného transportu a zastavení buněčného cyklu v mitóze v důsledku narušení dynamické nestability mikrotubulů. V některých nádorových buňkách buněčný cyklus dál pokračuje, což může vést ke genetické nestabilitě. Taxany také negativně ovlivňují expresi antiapoptického faktoru Bcl-2, což může vést ke zvýšené frekvenci apoptózy. Převzato z (Mikula-Pietrasik et al. 2019).

Výsledný osud nádorové buňky po působení taxanů může být různý. První možností je indukce buněčné smrti již v průběhu mitózy, nebo naopak dojde k dokončení mitózy bez řádné segregace chromozomů (tzv. mitotic slippage), což vede ke vzniku tetraploidní buňky v G1 fázi buněčného cyklu. Pokud nejsou tyto abnormální buňky zničeny apoptózou, mohou podstupovat další buněčná dělení či setrvávat v klidovém stavu. Přesné mechanismy rozhodující o možnostech osudu buňky po působení taxanů nebyly doposud identifikovány (*Mikula-Pietrasik et al. 2019; Weaver 2014*).

### **2.5.2 Metabolismus a transport taxanů**

Taxany patří k jedněm z nejvyužívanějších chemoterapeutik v rámci systémové léčby pro časná i pokročilá stadia solidních nádorů. Z tohoto důvodu je intenzivně studován nejen metabolismus taxanů v lidském organismu, ale také jejich farmakokinetika a farmakodynamika, které se mohou podílet na rozvoji chemorezistence. Nicméně doposud se nepodařilo všechny aspekty metabolismu taxanů zcela objasnit (*Maloney et al. 2020; Muth et al. 2020*).

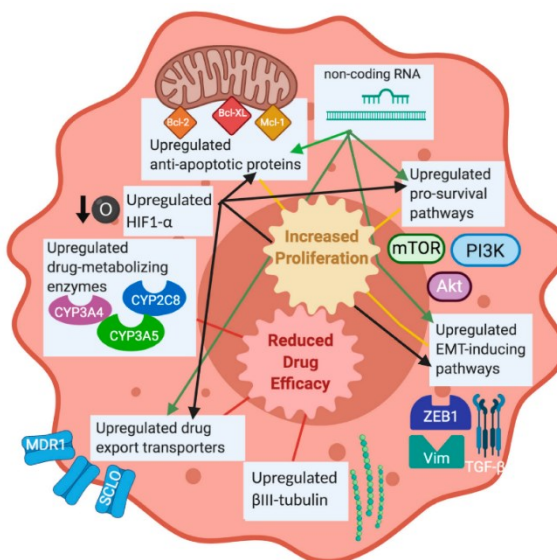
Taxany jsou obdobně jako většina xenobiotik primárně metabolizovány v játrech spolupůsobením různých proteinů a enzymů. Významnou skupinu enzymů metabolizujících taxany tvoří cytochromy podrodiny P450 (především P2C8 a 3A4), které se aktivně podílí na metabolické transformaci paclitaxelu i docetaxelu a ovlivňují množství vzniklých metabolitů (*Maloney et al. 2020; Zheng et al. 2016; Vaclavikova et al. 2004*). Mezi nejvýznamnější metabolity vzniklých po biotransformaci taxanů jsou řazeny hydroxylované sloučeniny, jež podléhají další oxidaci a následnému vyloučení žlučí či stolicí (*Maloney et al. 2020; Muth et al. 2020*).

Přestože samotný metabolismus klasických taxanů (paclitaxelu a docetaxelu) vykazuje celou řadu stejných aspektů, jejich farmakokinetika se výrazně liší. U paclitaxelu byla totiž prokázána přímá souvislost mezi farmakokinetikou a dávkou léčiva. To znamená, že jednotlivé parametry farmakokinetiky mohou být ovlivněny celou řadou faktorů spojených s absorpcí léčiva, transportem, biotransformací či jeho vylučováním. Právě nelineární farmakokinetika paclitaxelu vysvětluje možnost vyloučení malého množství nezměněného léčiva v moči či stolici. Oproti tomu pro docetaxel je typická lineární farmakokinetika, jejíž parametry nejsou dávkou léku ovlivněny (*Muth et al. 2020; Oshiro et al. 2009*).

### 2.5.3 Rezistence vůči taxanům a mechanismy jejího rozvoje

Jak již bylo zmíněno, rezistence vůči taxanům představuje nejzávažnější problém negativně ovlivňující účinnost léčby. Samotný vznik rezistence je podmíněn více faktory a je spojen s celou řadou mechanismů, které jsou velmi komplexní, a proto je jejich identifikace značně obtížná (Maloney *et al.* 2020).

Rezistenci vůči taxanům můžeme rozdělit dle mechanismu rozvoje na primární neboli přirozenou, která se vyskytuje u pacientů bezprostředně po první dávce cytostatika (Chatterjee a Bivona 2019; Holohan *et al.* 2013). V tomto případě má léčba velmi malý, nebo žádný účinek, a to i přestože pacienti nebyli doposud léčeni tímto způsobem. Druhým typem je sekundární rezistence, jež se rozvíjí jako odpověď na již proběhlou léčbu cytostatiky. Její hlavní příčinou je ztráta vnímavosti na dané léčivo (Chatterjee a Bivona 2019; Wang *et al.* 2019). V některých případech může docházet k tzv. zkřížené rezistenci, kdy nádorové buňky vykazují rezistenci vůči funkčně i strukturně obdobným cytostatikům. Pokud se tato zkřížená rezistence objeví mezi odlišně působícími cytostatiky, tak hovoříme o tzv. mnohočetné lékové rezistenci (MDR) (Bukowski *et al.* 2020; Wang *et al.* 2019). Rozvoj rezistence vůči taxanům bývá asociován s celou řadou různých změn inhibujících jejich účinnost, které jsou přehledně znázorněny na následujícím **Obrázku č. 8**.



**Obrázek 8:** Shrnutí základních mechanismů asociovaných s rozvojem rezistence vůči taxanům. Převzato z (Maloney *et al.* 2020).

Vznik rezistence bývá nejčastěji spojován se změnami farmakokinetiky, jež ovlivňují intracelulární koncentrace léčiva. Mezi tyto změny patří například snížená resorpce, zvýšené vylučování či urychlený rozklad léku, který často souvisí s nadměrnou aktivitou metabolizujících enzymů. Se změnami farmakokinetiky jsou spojovány také alterace v expresi transportérů rodiny ABC (ATP binding cassette), které se podílejí na transportu léčiva přes buněčnou membránu. Tyto transportéry svým působením snižují intracelulární koncentraci léčiva a mohou tak podpořit rozvoj chemorezistence. Mezi nejvýznamnější zástupce této rodiny patří P-glykoprotein (P-gp) kódovaný genem *MDR1/ABCB1*, jenž je aktivním účastníkem vylučování cytostatika ven z buňky (Maloney et al. 2020; Wang et al. 2019).

Kromě změn farmakokinetiky může rozvoj rezistence souviset s vyšší rychlostí reparace poškozené DNA. Většina nádorových buněk totiž vykazuje celou řadu alterací v těchto mechanismech, které mohou přímo souviset se sníženou účinností léčiva. Mimo jiné se tyto alterace v reparaci DNA podílejí na indukci genomové nestability, jež může vést k aneuploidii či ke vzniku nových mutací (Wang et al. 2019). Tyto nově vzniklé mutace mohou být jednou z hlavních příčinou rozvoje rezistence a selhání léčby. Nicméně pro nádorové buňky je typické celé spektrum různých mutací, a proto je obtížné určit právě ty, které jsou přímo zodpovědné za vznik rezistence. Významnou roli hraje i zmíněná aneuploidie, kdy v průběhu mitózy může dojít ke ztrátě genů nezbytných pro metabolismus či transport léčiva (Bukowski et al. 2020).

Dalším možným mechanismem vedoucím k rozvoji rezistence jsou změny působení proteinů asociovaných s mikrotubuly, jež mohou inhibovat působení taxanů. Typickým příkladem je protein Tau, který je spojován s rezistencí vůči paclitaxelu v důsledku kompetice o totéž vazebné místo na mikrotubulech. Zároveň bylo prokázáno, že umlčení tohoto proteinu vede ke snížení buněčné proliferace, stimulaci apoptózy a především ke zvýšení senzitivity buněk vůči paclitaxelu (Maloney et al. 2020; Smoter et al. 2011). Obdobným mechanismem může být rezistence podpořena i variabilní expresí izotypů tubulinu. Typickým příkladem je nadměrná exprese  $\beta$  III-tubulinu či redukce polymerizace tubulinu, jež může snadno vést až k hyperpolymerizaci v důsledku působení taxanů (Maloney et al. 2020).



Na rozvoji rezistence se mohou podílet i microRNA (miRNA), což jsou krátké nekódující RNA, které vazbou na 3'UTR regulují translaci a genovou expresi. Samotná rezistence je pak vyvolána alterovanou expresí jednotlivých typů miRNA, které mají velmi široké spektrum působení. Nejčastěji se jedná o regulátory buněčného cyklu, přežívání, apoptózy, buněčného metabolismu a transportu léčiv (*Maloney et al. 2020; Gebert a MacRae 2019*). Obdobně může být rezistence vyvolána i působením dlouhých nekódujících RNA (lncRNA), jež se díky své snadné detekci do budoucna jeví jako vhodné biomarkery pro odhalení rezistence (*Maloney et al. 2020*).

Vznik rezistence může být asociován i s hypoxií nádorových buněk, jež je u některých typů prsních karcinomů dokonce nezbytnou podmínkou pro rozvoj rezistence. V důsledku hypoxie dochází u nádorových buněk k aktivaci či inhibici specifických signalizací, které mohou mít zásadní vliv na rozvoj rezistence. Bylo prokázáno, že chemoterapie může stimulovat aktivitu transkripčního faktoru HIF, jenž je klíčovým regulátorem odpovědi na hypoxii a podílí se tedy i na alteraci již zmíněných signalizací (*Maloney et al. 2020; Bukowski et al. 2020*).

## **2.6 Nové mechanismy rezistence a potencionální biomarkery léčebné odpovědi**

Z hlediska překonání lékové rezistence nádorových buněk se klade důraz na nalezení vhodných léčebných alternativ a látek, které by byly účinné na rezistentní formy nádorů. Z řady těchto tzv. MDR-reverzních látek jsou potenciálně zajímavé různé deriváty vyvinuté na bázi klasických taxanů s možnou vyšší účinností na rezistentní nádorové buňky. Rovněž jsou hledány markery v buněčných drahách s možnou rolí v rezistenci nádorových buněk a účinnosti taxanů, které mohou být využity v rámci cílené terapie či jako potencionální biomarkery lékové rezistence a léčebné odpovědi. Na oddělení Toxikogenomiky byly na základě předchozího výzkumu identifikovány některé vhodné taxanové deriváty ke studiu jejich účinnosti na rezistentní nádorové buňky. Zároveň byly identifikovány pomocí vysokokapacitních metod kandidátní molekuly (ABCC3, TRIP6, CPS1), které by se právě v rezistenci a léčebné odpovědi na taxany mohly uplatnit. Účinností takových látek a úlohou nových kandidátních molekul v rezistenci a odpovědi na léčbu se zabývá předkládaná diplomová práce.

### 2.6.1 Nové taxanové deriváty

Jednou z možností překonání rezistence vůči taxanům je syntéza a vývoj nových derivátů s odlišnými substituenty v chemické struktuře, jež pozměňují některé parametry jejich metabolismu, zvyšují rozpustnost a zároveň zlepšují celkový protinádorový účinek. Proto je v posledních letech kladen velký důraz na studium závislosti struktury a možné účinnosti těchto nových taxanů (Zheng *et al.* 2017; Ojima *et al.* 2016). Na výzkumu účinnosti nově syntetizovaných taxanových derivátů se významně podílí i Oddělení toxikogenomiky SZÚ v Praze ve spolupráci s pracovištěm prof. Iwao Ojimy ze Stony Brook University v New Yorku.

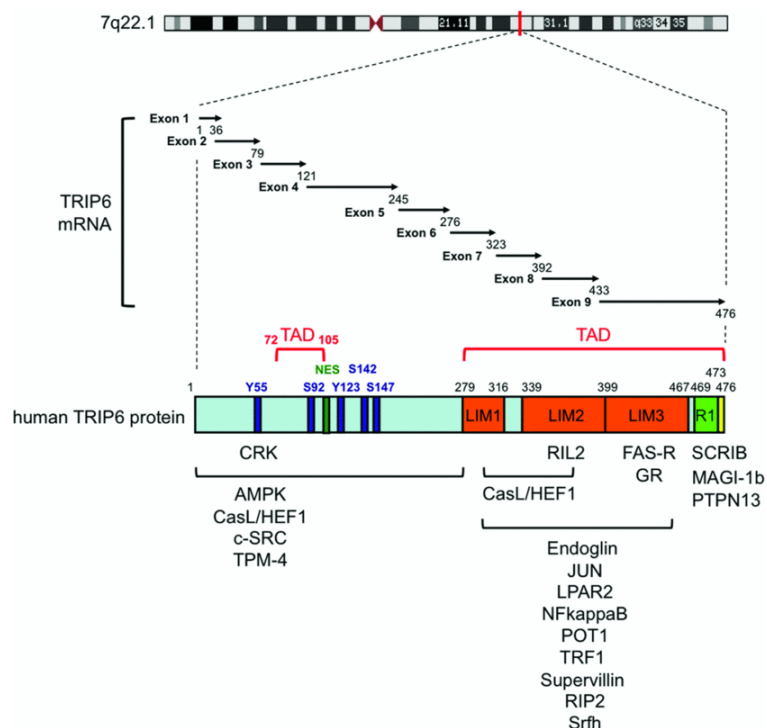
Změny struktury nových taxanových derivátů se nejčastěji týkají C konce. Taxany druhé generace jsou modifikovány pouze v poloze C10 a C'3, zatímco taxany třetí generace obsahují navíc modifikace i v poloze C2. Tyto změny nejčastěji spočívají v nahrazení fenylové skupiny v paclitaxelu, docetaxelu či cabazitaxelu za 2-methyl-1-propenyl nebo 2-methylpropyl (Ojima *et al.* 2016; 2018)

Doposud byla takto syntetizována celá řada nových derivátů druhé a třetí generace, u kterých se do budoucna předpokládá možnost využití v terapii nádorových onemocnění. Tito zástupci jsou totiž schopni překonat hned dva mechanismy rezistence vůči konvenčním taxanům, a to rezistenci způsobenou nadměrnou expresí P-gp či alterovanou expresí tubulárních podjednotek. U některých nově syntetizovaných derivátů (např. SB-T-1214; SB-T-1216; SB-T-121602; SB-T-12854; SB-T-121205) byl *in vitro* prokázán významný protinádorový účinek na různých typech rezistentních nádorových buněčných liniích, např. v buňkách karcinomu prsu či ovaria (Oliverius *et al.* 2019; Mohelnikova-Duchonova *et al.* 2017; Zheng *et al.* 2017; Němcová-Fürstová *et al.* 2016; Ojima *et al.* 2016; Ehrlichová *et al.* 2012; Otová *et al.* 2012; Kovář *et al.* 2009; Vobořilová *et al.* 2009; Ehrlichová *et al.* 2005a; Ehrlichová *et al.* 2005b; Gut *et al.* 2006). Významná aktivita některých těchto taxanových derivátů byla také prokázána *in vivo* (Oliverius *et al.* 2019; Mohelnikova-Duchonova *et al.* 2017; Otová *et al.* 2012). Tyto nové taxanové deriváty se tedy zdají být vhodnými léčivy pro využití v terapii rezistentních forem nádorů.

### 2.6.2 *TRIP6* a rezistence

Adaptorový protein TRIP6 (Thyroid hormone receptor-interacting protein 6) je primárně exprimován v epiteliálních buňkách, kde reguluje celou řadu buněčných procesů. Klíčovou roli hraje především v reorganizaci cytoskeletu, buněčné migraci, adhezi a invazivitě (*Liu et al. 2020; Miao et al. 2016*). Přítomnost specifických LIM domén umožňuje tomuto proteinu interagovat s cílovými molekulami a ovlivňovat tak jejich aktivitu. Tímto způsobem může TRIP6 ovlivňovat např. transkripční faktor NF- $\kappa$ B a AMPK signalizaci. Působením na proteiny chránící telomery dokonce může indukovat genomovou nestabilitu, která je typickým znakem většiny nádorů. Dále je tento protein zapojen v celé řadě procesů související s proliferací, diferenciací a přežíváním. Zároveň se předpokládá významná role v iniciaci kancerogeneze, růstu nádoru a také v tvorbě metastáz (*Yang et al. 2020; Willier et al. 2011*).

Gen pro *TRIP6* se nachází na krátkém raménku chromozomu 7, konkrétně v oblasti 7q22. Skládá se ze 9 exonů kódujících mRNA o délce 1431 bp. Výsledný protein je tvořen 476 aminokyselinami, v N-terminální oblasti se pak vyskytují typické strukturní motivy bohaté na prolin umožňující vazbu na SH3 domény cílových proteinů (*Willier et al. 2011; Murthy et al. 1999*). Zároveň tato N-terminální oblast obsahuje také 5 míst pro fosforylaci (Tyr<sup>55</sup>, Ser<sup>92</sup>, Tyr<sup>123</sup>, Ser<sup>142</sup>, Ser<sup>147</sup>), jež regulují aktivitu TRIP6. C-terminální konec obsahuje 3 dvojité zinc-finger domény, které jsou nezbytné pro zprostředkování interakce s celou řadou cílových proteinů. V obou terminálních oblastech se pak nachází nukleární lokalizační sekvence a také mnohočetné transaktivační domény (*Willier et al. 2011; Wang a Gilmore 2001*). Celý gen včetně kódovaného proteinu je detailně popsán na **Obrázku č. 9**.



**Obrázek 9: Organizace a uspořádání genu *TRIP6*, *TRIP6* mRNA a proteinu *TRIP6*.**  
Převzato z (Willier et al. 2011).

Jak již bylo zmíněno, *TRIP6* funguje jako adaptorový protein, který je schopný rekrutovat celou řadu dalších proteinů nezbytných pro buněčnou migraci, adhezi, invazivitu, ale také pro reorganizaci cytoskeletu (Liu et al. 2020; Miao et al. 2016). Úloha v reorganizaci cytoskeletu byla potvrzena studiem různých typů buněk, kdy bylo prokázáno, že *TRIP6* je schopen translokace na stresová aktinová vlákna v závislosti na určitém stimulu. Typickým příkladem tohoto stimulu je přítomnost membránového glykoproteinu endoglinu, který je součástí receptoru pro TGF $\beta$ . Právě interakce endoglinu s *TRIP6* indukuje tvorbu stresových aktinových vláken, jež jsou pak aktivními účastníky reorganizace cytoskeletu. Bylo prokázáno, že formování těchto aktinových vláken je závislé na expresi *TRIP6* (Liu et al. 2020; Willier et al. 2011).

Podobným způsobem interaguje *TRIP6* také s periferním membránovým proteinem supervillinem, jenž funguje jako negativní regulátor stresových aktinových vláken a formování fokální adheze. Protein *TRIP6* tedy funguje zároveň jako pozitivní i negativní regulátor buněčné migrace a invazivity alterací stresových aktinových vláken. Esenciální role tohoto proteinu v migraci byla prokázána i na základě studií myších modelů infikovaných kmenem *Salmonella typhimurium*, kdy při vazbě toxinu na *TRIP6* došlo k významnému rozšíření infekce. Přepokládá se tedy, že přímá interakce s *TRIP6* je nezbytná pro buněčnou migraci (Zhu et al. 2019; Willier et al. 2011).

Kromě své role v buněčné motilitě se TRIP6 účastní celé řady signalizačních kaskád. Nejvýznamnější úlohu má v NF- $\kappa$ B signalizaci, která reguluje transkripci genů pro imunitní odpověď, indukci zánětu a antiapoptotických genů (*Liu et al. 2017; Willier et al. 2011*). V této signalizaci TRIP6 funguje jako regulátor aktivace transkripčních faktorů, která je podpořena i přítomností LIM domén TRIP6 na kaspáze rekrutujících doménách proteinu RIP2 a REL. Tyto proteiny jsou totiž klíčové pro aktivaci NF- $\kappa$ B. Zároveň bylo zjištěno, že TRIP6 významně stimuluje aktivaci prozánětlivých cytokinů TNF  $\alpha$  a IL1 (*Liu et al. 2020; Lin a Lin 2011*).

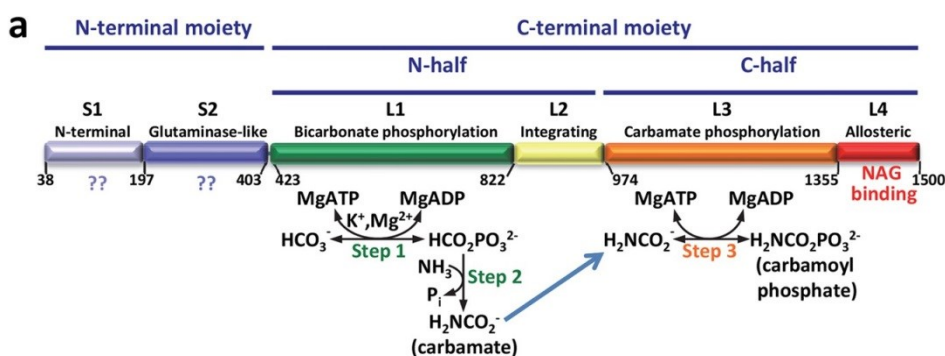
Na základě výše zmíněných fyziologických funkcí TRIP6 byla potvrzena úloha tohoto proteinu nejen v rozvoji a progresi nádoru, ale také při vzniku rezistence nádorových buněk vůči chemoterapii (*Liu et al. 2020; Zhao et al. 2020; Willier et al. 2011*). Doposud byla prokázána souvislost nadměrné exprese *TRIP6* se zvýšenou progresí u hepatocelulárních karcinomů, karcinomů prsu a také u kolorektálních nádorů. Předpokládá se, že tento adaptorový protein významně ovlivňuje nejen progresi u jiných typů nádorů, ale také rozvoj rezistence vůči apoptóze zprostředkovaný aberantní aktivací NF- $\kappa$ B signalizace (*Yang et al. 2020; Zhao et al. 2020; Ling et al. 2019; Zhao et al. 2017*). Právě proto se protein TRIP6 jeví jako vhodný biomarker prognózy a účinnosti léčby nádorových onemocnění.

### **2.6.3 CPS1 a rezistence**

CPS1 (Carbamoyl phosphate synthetase-1) je klíčovým iniciačním enzymem močovinového cyklu, kde katalyzuje vstup amoniaku do reakce. Tento metabolický cyklus probíhá v játrech a je nezbytný pro odbourávání a následné vyloučení nadbytečného dusíku (*Nitzahn a Lipshutz 2020; Wu et al. 2020a*). Vyšší exprese *CPS1* je typická nejen pro jaterní buňky, ale také pro střevní buňky, kde se tento enzym skrz intramitochondriální močovinový cyklus podílí na syntéze argininu. Exprese *CPS1* je nepřímo regulována celou řadou různých mechanismů. Mezi ty nejvýznamnější patří např. aktivace AMPK signalizace a regulace malou nekódující RNA miR-10A-3p (*Nitzahn a Lipshutz 2020; Sun et al. 2016*).

CPS1 je komplexní enzym, který v močovinovém cyklu zajišťuje ve třech krocích přeměnu amoniaku na karbamoylfosfát, bikarbonát a dvě molekuly ATP. Nejprve dochází k fosforylaci bikarbonátu v přítomnosti ATP za vzniku karbamoylfosfátu, který je následně fosforylován druhou molekulou ATP. Výsledkem této přeměny je uvolnění glutamátu a amoniaku, jenž je nezbytný pro aktivitu CPS1 (Diez-Fernandez a Häberle 2017). Samotná aktivita enzymu je pak regulována v průběhu močovinového cyklu v závislosti na koncentraci amoniaku (Nitzahn a Lipshutz 2020; Diez-Fernandez a Häberle 2017).

Gen pro *CPS1* je vysoce konzervovaný a nachází se na krátkém raménku druhého chromozomu, konkrétně v oblasti 2q34. Obsahuje 38 exonů spolu s 37 introny, které jsou translatovány do 5761 bp dlouhé mRNA (Nitzahn a Lipshutz 2020; Summar et al. 2003). Výsledný polypeptid je 160 kDa dlouhý. Kromě malé a velké podjednotky obsahuje také domény označované L1–L4, které se účastní jednotlivých reakcí a podílejí se na stabilitě a aktivaci enzymu (Diez-Fernandez a Häberle 2017; de Cima et al. 2015). Přesná úloha jednotlivých domén v detoxikaci amoniaku je znázorněna na **Obrázku č. 10**. Kromě zmíněných L domén obsahuje CPS1 také N-terminální a C-terminální úseky, jež vykazují značnou mezidruhovou homologii. C-terminální doména obsahuje speciální vazebné místo pro N-acetyl-L-glutamát (NAG), jenž je nezbytný pro aktivaci CPS1 (Nitzahn a Lipshutz 2020; Diez-Fernandez a Häberle 2017; de Cima et al. 2015).



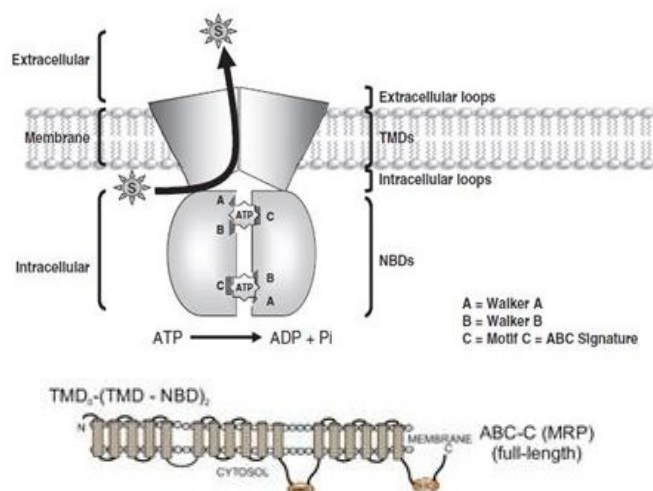
**Obrázek 10: Struktura CPS1 a úloha jeho domén v detoxikaci amoniaku.** Převzato z (de Cima et al. 2015).

Vzhledem ke své fyziologické funkci je CPS1 důležitý i pro nádorové buňky, kde se taktéž podílí na detoxikaci amoniaku. Kromě močovinového cyklu může v nádorových buňkách zajišťovat také syntézu pyrimidinu, který je nezbytný pro stimulaci proliferace. Zvýšená exprese tohoto enzymu je charakteristická pro celou řadu nádorů, typicky se jedná o karcinomy žaludku, plic, prostaty, prsu či endometria. Možnou příčinou zvýšené exprese *CPS1* může být aberantní metabolismus nádorových

buněk, kdy kromě zvýšené potřeby glutaminu dochází i ke zvýšené produkci amoniaku (Muhammad a Kim 2020; Nitzahn a Lipshutz 2020). Nicméně ne vždy bývá exprese *CPS1* zvýšená, typickým příkladem jsou nádory tenkého střeva a hepatocelulární karcinomy, kde je exprese tohoto enzymu značně snížena nebo dokonce potlačena. Přesný důvod tohoto jevu však nebyl doposud objasněn. Předpokládá se, že klíčovou úlohou hraje methylace, která může způsobit inaktivaci genu pro *CPS1* (Nitzahn a Lipshutz 2020).

#### 2.6.4 ABCC3 a rezistence

ABCC3 (ATP-binding cassette subfamily C member 3) je řazen do rodiny ABC transportérů, které hrají klíčovou roli ve vylučování a eliminaci látek z buňky. Mezi jejich hlavní substráty patří produkty metabolismu, steroly, lipidy a xenobiotika (Hlaváč *et al.* 2020; Kenna *et al.* 2018). Rodina ABC transportérů čítá 49 membránových proteinů, jež lze na základě podobných vlastností rozdělit do 7 skupin ABC A–ABC G. Z hlediska rozvoje rezistence jsou nejvýznamnější zástupci ABCB1, podrodina ABCC a ABCG2, kteří jsou aktivními účastníky transportu léčiv (Hlaváč *et al.* 2020; Liu 2019). Základní struktura ABCC3 sestávající ze dvou vysoce konzervovaných cytoplazmatických domén pro vazbu ATP (NBDs) a dvou transmembránových domén (TMDs) je znázorněna na **Obrázku č. 11**. Cytoplazmatické domény obsahují specifické sekvenční motivy aminokyselin, označované jako *Walker A*, *Walker B*, *Signature C*, které jsou nezbytné pro stabilizaci, navázání a následnou hydrolýzu ATP. Transmembránové domény obvykle obsahují 5–6 membránových helixů, jež poskytují specifitu pro substrát (He *et al.* 2019; Mesci *et al.* 2019).



**Obrázek 11: Základní struktura ABC transportérů (nahore) a struktura transportérů podrodiny ABCC (dole). Převzato z (Baral, 2017 a Boumendjel 2009).**

ABCC3 nebo také MRP3 se uplatňuje nejen při transportu léčiv ale také některých žlučových solí (například taurocholátu a glycocholátu). Neméně významnou roli má tento protein také v transportu konjugované formy bilirubinu, spolu s ABCC2 se totiž podílí na jeho detoxikaci (*Kenna et al. 2018; Schoor et al. 2014*). Transportér ABCC3 se hojně vyskytuje v tkáních účastnících se absorpce, distribuce a také eliminace léčiv. Nachází se tedy v basolaterální membráně hepatocytů a enterocytů, dále ve slinivce, ledvinách a také v adrenální žláze (*Bruhn a Cascorbi 2014; Schoor et al. 2014; Liu 2019*).

Gen pro *ABCC3* je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 17, konkrétně v oblasti 17q22 a obsahuje 31 exonů, které kódují 1527 aminokyselin (*Bruhn a Cascorbi 2014*). Výsledný protein je dlouhý 70 kDa a obsahuje 18 transmembránových domén, jež vykazují značnou homologii s doménami proteinu ABCC1 (*Zhang et al. 2015; van de Wetering et al. 2009*). Gen pro *ABCC3* je značně polymorfní, doposud bylo prokázáno více než 100 různých jednonukleotidových změn (SNP), které mohou mít značný vliv na funkci vzniklého proteinu. Právě tyto polymorfismy pravděpodobně hrají klíčovou roli v modulaci odpovědi na léčbu a také v případném rozvoji chemorezistence (*Bruhn a Cascorbi 2014; Schoor et al. 2014*).

Jak již bylo zmíněno, ABCC3 je řazen do podrodiny ABC-C, jež hraje klíčovou roli v rozvoji mnohočetné lékové rezistence (*Hlaváč et al. 2020; Liu 2019*). Bylo prokázáno, že právě zvýšená exprese ABCC3 může souviset nejen s rozvojem a následnou progresí některých nádorů, ale také se vznikem rezistence vůči chemoterapeutikům (*Liu et al. 2016; Adamska et al. 2019*). Typickým příkladem jsou karcinomy prsu s pozitivním HER2, u kterých byla potvrzena souvislost mezi zvýšenou expresí ABCC3 transportérů a rozvojem chemorezistence či nižší odpovědí na léčbu (*Liu et al. 2016; Wang et al. 2020*).

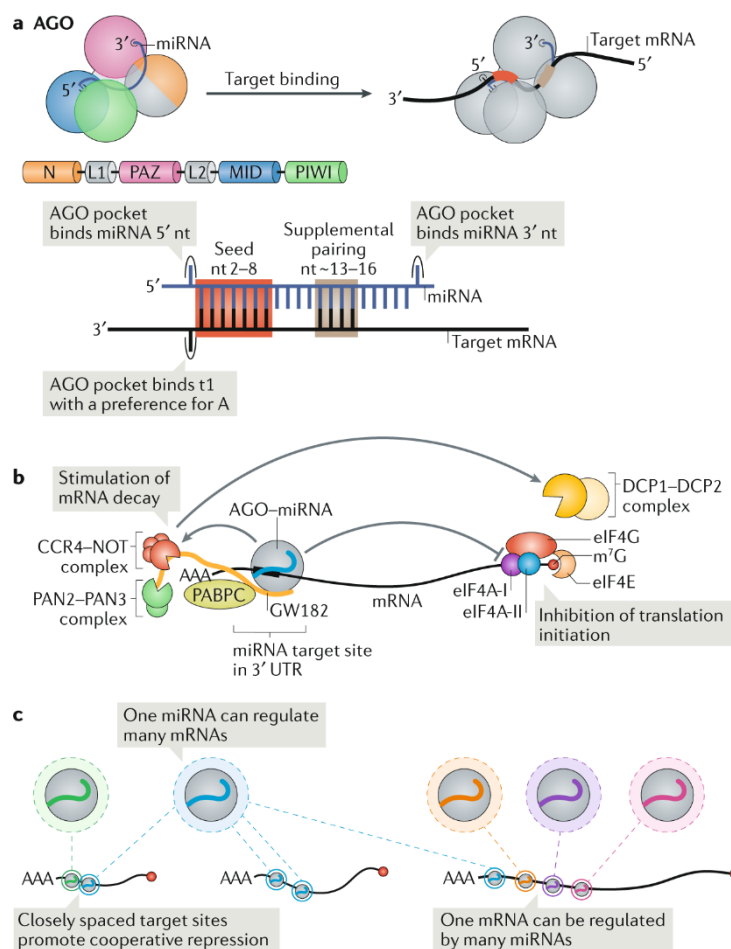


### 2.6.5 MiRNA a rezistence

MiRNA jsou řazeny mezi krátké nekódující molekuly RNA, které se podílejí na posttranskripční regulaci genové exprese interakcí s cílovou mRNA (*Ali Syeda et al. 2020; Lu a Rothenberg 2018*). Ovlivněním genové exprese svých cílových genů, jež hrají roli v procesu a vzniku rezistence nádorových buněk, mohou miRNA ve fenoménu rezistence hrát významnou roli. Tyto nekódující RNA se vykazují značnou tkáňovou specifitou a zajišťují celou řadu biologických funkcí nejen u savců, ale také u většiny mnohobuněčných organismů (*Ali Syeda et al. 2020; Jansson a Lund 2012*). Předpokládá se, že miRNA zaujímají kolem 5 % lidského genomu a podílejí se na regulaci až 60 % genů kódujících proteiny. Doposud bylo identifikováno více než 2500 lidských miRNA a přibližně 1900 pre-miRNA prekurzorů pro tyto nekódující molekuly (*Gebert a MacRae 2019; MacFarlane a Murphy 2010*).

MiRNA jsou jednovláknové molekuly RNA o délce obvykle mezi 19–25 nukleotidy, které jsou po maturaci schopné regulovat genovou expresi. Proces maturace miRNA sestává nejprve z přepisu příslušných genů do tzv. primárních transkriptů označovaných jako pri-miRNA, které jsou následně sestřiženy na prekurzory pro maturovanou miRNA (*Gebert a MacRae 2019*). Po maturaci tyto nekódující RNA formují s proteinem Argonaute 2 tzv. RISC komplex (RNA-induced silencing complex), jež se váže na cílové místo v oblasti 3'UTR na mRNA. Navázání tohoto komplexu vede buď ke snížení translace nebo k deadenylaci a následné degradaci cílové mRNA. Výsledný osud této mRNA závisí na míře komplementarity jednotlivých bází s oblastí na 5' konci miRNA (*Casey et al. 2019; Hayes et al. 2014*).

Vzhledem k poměrně krátkému vazebnému místu, které obvykle čítá 6–8 bází může miRNA cílit na velké množství genů, zároveň však může více miRNA regulovat expresi jednoho genu (*Gebert a MacRae 2019; Hayes et al. 2014*). Proto bývá funkce těchto malých RNA značně rozmanitá. Mohou ovlivňovat celou řadu různých fyziologických, ale i patologických buněčných procesů. Za hlavní funkci je však považována regulace transkripce proteinů vazbou na komplementární sekvence cílové mRNA (*Gebert a MacRae 2019; Jansson a Lund 2012*). Prostřednictvím cílových genů mohou tyto malé nekódující RNA významně ovlivnit proliferaci, průběh buněčného cyklu, diferenciaci, migraci, buněčný metabolismus a také další buněčné procesy, jejichž alterace bývá spojená s rozvojem nádorového onemocnění (*Ali Syeda et al. 2020*). Funkce miRNA a mechanismy její regulace jsou shrnuty na **Obrázku č. 12**.



**Obrázek 12: Přehled funkcí miRNA.**

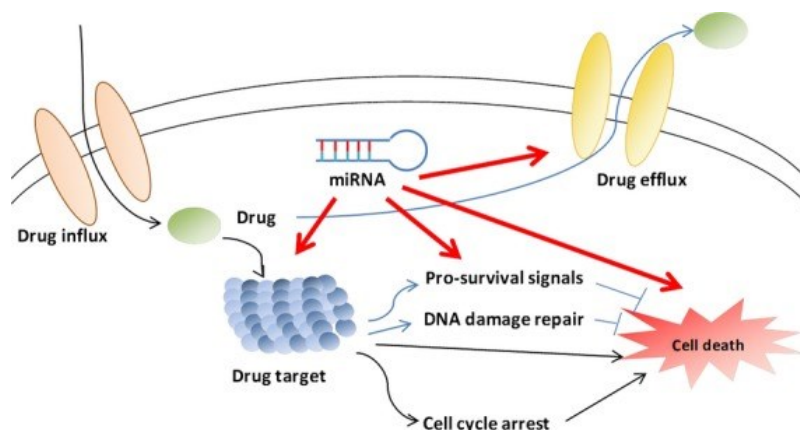
**(a)** Zralá microRNA formuje komplex s proteinem Argonaut, který obsahuje čtyři vazebné domény (N, PAZ, MID, PIWI) a dvě tzv. linker oblasti (L1, L2). Tyto domény jsou nezbytné pro správnou vazbu na microRNA.

**(b)** Umlčení genové exprese pomocí microRNA je realizováno na podkladě kooperace celé řady faktorů, jejichž součinností dochází k inhibici iniciace translace.

**(c)** Spolupůsobením více typů miRNA může dojít k účinnější inhibici, nicméně i jedna miRNA může regulovat celou řadu různých mRNA. Zároveň může být jedna cílová mRNA ovlivňována různými typy miRNA. Převzato z (Gebert a MacRae, 2019).

MiRNA se účastní různých onkogenních signalizací, kde jsou klíčovými regulátory a mohou tak ovlivňovat celou řadu buněčných procesů spojených s rozvojem nádorového onemocnění (Ali Syeda et al. 2020; Lujambio a Lowe 2012). Některé miRNA dokonce mohou fungovat obdobně jako onkogeny či tumorsupresory, nicméně identifikace přesné souvislosti mezi jejich expresí a rozvojem nádorového onemocnění je kvůli rozmanitým funkcím značně obtížná (Ali Syeda et al. 2020; Gebert a MacRae 2019; Lujambio a Lowe 2012). Předpokládá se, že role miRNA v iniciaci kancerogeneze je obdobná jako úloha transkripčních faktorů, jejichž expresi mohou tyto nekódující RNA regulovat. Avšak aktivní transkripční faktory mohou ovlivňovat expresi jednotlivých miRNA. Základní mechanismy spojené s úlohou miRNA v rozvoji rezistence jsou shrnuty na **Obrázku č. 13**. Mezi typické zástupce nádorových miRNA patří rodina miR-29,

které fungují jako tumorsupresory v rozvoji karcinomu plic a zároveň mají onkogenní potenciál u prsních karcinomů (Peng a Croce 2016; Lujambio a Lowe 2012).



**Obrázek 13: Role miRNA v rozvoji chemorezistence.** Převzato z (Cui et al, 2013).

MiRNA asociované s nádory často podléhají různým somatickým mutacím a epigenetickým změnám, které významně ovlivňují jejich následnou expresi (Ali Syeda et al. 2020; Lujambio a Lowe 2012). Každý nádor má kromě charakteristického spektra mutací i alterované exprese různých typů miRNA, což lze využít pro jeho klasifikaci. Abnormální exprese miRNA byla pozorována u hematologických malignit, solidních nádorů, a především u nádorových buněk rezistentních vůči chemoterapeutikům (Lujambio a Lowe 2012; Cui et al. 2013).

Předpokládá se, že tyto malé nekódující RNA mohou ovlivnit většinu již zmíněných mechanismů spojených s rozvojem chemorezistence a mohou hrát klíčovou roli v ovlivnění účinnosti cytostatik. Významná role v rozvoji rezistence byla prokázána u rodiny miRNA-200c (miR-141, miR-200a, miR-200b a miR-429) a ovariálního karcinomu, které svým působením ovlivňují expresi  $\beta$ III tubulinu a mění tak strukturu mikrotubulů (Cui et al. 2013).

### 3 Cíl práce

**1) Hlavním cílem diplomové práce bylo studium genového expresního profilu kandidátních genů *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* souvisejících s rezistencí nádorových buněk vůči taxanům u pacientek s karcinomem ovaria a prsu.** Cílem bylo stanovit hladiny genové exprese ve vzorcích karcinomu ovaria a prsu a nalézt případný vztah mezi mírou exprese a prognózou onemocnění či léčebnou odpovědí. Na vybraných vzorcích karcinomu prsu byla zavedena metodika sledování exprese nekódujících miRNA pro odhalení možného ovlivnění genové exprese těmito krátkými nekódujícími RNA. K dosažení tohoto cíle byly provedeny následující analýzy:

- izolace genetického materiálu (RNA/DNA) ze vzorků ovariální a prsní nádorové tkáně
- příprava cDNA pomocí reverzní transkripce
- stanovení exprese genů pro *ABCC3*, *TRIP6*, *CPS1* pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase normalizované vůči referenčním genům (*UBC*, *PPIA*, *YWHAZ* u karcinomu ovaria a *MRPL19*, *EIF2B1*, *IPO8* u karcinomu prsu)
- stanovení exprese miRNA-665 pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase normalizované vůči referenční U6-snRNA
- statistické hodnocení a nalezení asociace mezi hladinou exprese genů *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6*, hladinou miRNA-665, klinicko-patologickými daty pacientek a odpovědí na léčbu.

**2) Druhým cílem předkládané diplomové práce byla studie *in vitro*,** ve které byla porovnána účinnost konvenčního taxanu paclitaxelu a nových taxanových derivátů SB-T experimentální řady 1216 v senzitivních a paclitaxel-rezistentních experimentálních nádorových ovariálních buněčných liniích SKOV3/S a SKOV3/PCT-RES (SKOV3/R). Nové SB-T taxany zde byly použity jako možné potenciální preparáty pro léčbu rezistentních nádorů. V obou typech linií byly také hledány možné rozdíly expresního profilu kandidátních genů *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* a v případě významné deregulace také změny exprese před a po jejich ošetření konvenčním taxanem paclitaxelem či novými taxanovými SB-T deriváty. Cílem bylo odhalit případné deregulace genové exprese způsobené aplikací taxanů.

K dosažení tohoto cíle byly provedeny následující analýzy:

- stanovení hodnoty  $IC_{50}$  paclitaxelu a čtyř taxanových derivátů SB-T řady 1216 pomocí fluorescence v senzitivních SKOV3/S a rezistentních SKOV3/PCT-RES ovariálních nádorových buňkách
- stanovení případných změn exprese genů *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* v obou typech linií a v případě významně deregulovaného genu i po aplikaci paclitaxelu a čtyř taxanových derivátů SB-T řady 1216 v senzitivních SKOV3/S a rezistentních SKOV3/PCT-RES ovariálních nádorových buňkách pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase normalizované vůči referenčním genům *UBC*, *PPIA* a *YWHAZ*.

## 4 Metodika

### 4.1 Seznam použitých reagensií

| Výrobce   | Použité chemikálie a roztoky   |
|---|--|
| Ambion® (Texas, USA)  | Nuclease free H <sub>2</sub> O   |
| Applied Biosystems™<br>(Massachusetts, USA)   | TaqMan™ Gene Expression Assay (konkrétní přehled použitých esejí uveden v kapitole. 4.3.4 )                          |
|   | TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit   |
|   | TaqMan™ MicroRNA Expression Assay (konkrétní přehled použitých esejí uveden kapitole. 4.3.5)                         |
| Invitrogen™ (Massachusetts, USA)  | Primery pro gen <i>UBI</i>   |
|   | Quant-iT™ RiboGreen RNA Reagent and Kit  |
|   | TRIzol™ Reagent  |
| Laboratoř pod vedením prof. Iwao Ojimy Institute of Chemical Biology & Drug Discovery, State University of New York at Stony Brook, NY, USA | SB-T-1216  |
|   | SB-T-121602  |
|   | SB-T-121605  |
|   | SB-T-121606  |
| Lach-Ner (Česká republika)  | Ethanol (99,9%)  |
| Linde (Irsko)   | Tekutý dusík   |
| New England Biolabs (Massachusetts, USA)  | ΦX174 DNA-HaeIIIDigest marker  |
| PAN Biotech (Německo)   | McCoy's 5A Medium: L-Glutamine (1,5mM), NaHCO <sub>3</sub> (2.2 g/l)   |
|   | L-Glutamine-Penicillin-Streptomycin (200 mM L-Glutamine, 10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin) v 0.9 % NaCl |
|   | pyruvát sodný (100mM)  |
|   | HEPES pufr (1M)  |
|   | FBS (0,2μm)  |
|   | Trypsin (0,25 % / 0,02/EDTA)   |
| Promega (Wisconsin, USA)  | CellTiter-Blue® Cell Viability Assay   |
| QIAGEN (Německo)  | AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit  |
| Riedel-de Haën (Německo)  | Kyselina boritá  |
|   | EDTA   |
| Sigma-Aldrich (Missouri, USA)   | Agarosa  |
|   | Ethidium Bromid  |
|   | β-merkaptioethanol   |
|   | TE (Tris-EDTA) pufr  |
| Solis BioDyne (Estonsko)  | 5× FIREPol® Master Mix RTL with 12,5 mM MgCl <sub>2</sub>  |
|   | 5×HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (ROX)   |
| Top-Bio (Česká republika)   | 10x Taq buffer without Mg <sup>2+</sup>  |
|   | 25 mM MgCl <sub>2</sub>  |
|   | PCR dNTP mix   |
|   | Taq Purple polymerase (1 U/μl)   |
| Thermo Scientific™ (Massachusetts, USA)   | RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit  |

| Použité roztoky | Složení                                      |
|-----------------|--|
| TBE pufr        | 89 mM Tris; 89 mM kyselina boritá; 2 mM EDTA |

## 4.2 Seznam použitých přístrojů a softwaru

| Výrobce   | Přístroj   |
|---|--|
| Applied Biosystems <sup>TM</sup><br>(Applied Biosystems <sup>TM</sup> ) | Cycler – GeneAmp 9700 PCR System                                 |
|   | ViiAa7 Real-Time PCR System                                      |
| Clean Air Techniek B.V (Nizozemsko)                                     | Laminární box  |
| Corbett Life Science (Austrálie)  | Rotor-Gene <sup>TM</sup> 6000                                    |
| Eppendorf (Německo)   | Mastercycler <sup>®</sup> Nexus                                  |
| Gilson (Wisconsin, USA)   | Pomocná destička Trackman <sup>®</sup> na pipetování             |
| GraphPad Software (California, USA)                                     | GraphPad Prism 6.0   |
| LI-COR Biosciences (Nebraska, USA)                                      | Odyssey <sup>®</sup> Fc Imaging System                           |
| Major Science (California, USA)   | Termoblok (Dry bath Incubator)                                   |
| OPTIKA Microscopes (Itálie)   | Optický světelný mikroskop (XDS-1R)                              |
| SANYO (Japonsko)  | CO <sub>2</sub> -inkubátor – MCO-18AIC                           |
| SPSS Software (New York, USA)   | SPSS v16.0   |
| TECAN (Rakousko)  | Infinite <sup>®</sup> M200                                       |
| Thermo Fischer Scientific<br>(Massachusetts, USA)                       | Elektroforetický zdroj napětí (Owl <sup>TM</sup> EC-105 Compact) |
| VWR (Pennsylvania, USA)   | VWR <sup>®</sup> PCR Plate Spinner                               |

## 4.3 Metody práce s klinickými vzorky

V předkládané diplomové práci byly použity vzorky nádorové tkáně od pacientek s karcinomem ovaria (n = 113) a pacientek s karcinomem prsu (n = 88). Vzorky epiteliálního ovariálního karcinomu byly získány v rámci chirurgického výkonu z Fakultní nemocnice Motol, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a Fakultní nemocnice Plzeň. Celkově byly k dispozici vzorky od 91 pacientek před léčbou a od 24 pacientek po neoadjuvantní léčbě. K dispozici byla rovněž nenádorová kontrolní tkáň s prokázanou histopatologickou nepřítomností maligních buněk pro 17 žen s benigní diagnózou. Od pacientek s karcinomem prsu bylo použito celkem 89 vzorků nádorové tkáně, přičemž pro 6 vzorků byla k dispozici i párová kontrolní nenádorová tkáň. Vzorky tkáně poskytla Fakultní nemocnice Motol, Onkocentrum Medicon a Krajská nemocnice Tomáše Bati ve Zlíně. Od všech pacientek, s jejichž biologickým materiálem bylo pracováno, byl získán písemně doložený souhlas se zařazením do studie ve shodě s Helsinskou deklarací. Protokol studie byl schválen Etickou komisí SZÚ v Praze.

#### 4.3.1 Izolace nukleových kyselin a proteinu z nádorové tkáně

Izolace nukleových kyselin byla provedena z hluboce zmražených vzorků prsních a ovariálních tkání za pomoci kitu AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit (QIAGEN) dle instrukcí v manuálu AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Handbook (QIAGEN 2020). Izolaci nukleových kyselin a proteinu z ovariálních tkání provedla stejným způsobem Mgr. Kateřina Elsnerová, Ph.D. (*Oddělení Toxikogenomiky, SZÚ Praha*). U velmi malých vzorků s předpokládaným nízkým výtěžkem RNA byla provedena izolace pomocí Trizolu® (TRIzol™ Reagent). Veškerá manipulace s tkáněmi a RNA byla provedena v laminárním boxu (CleanAir Biohazard), za použití sterilních nástrojů a sterilního spotřebního materiálu. V rámci prevence kontaminace byl kladen důraz na využití materiálů a chemikálií bez přítomnosti nukleáz.

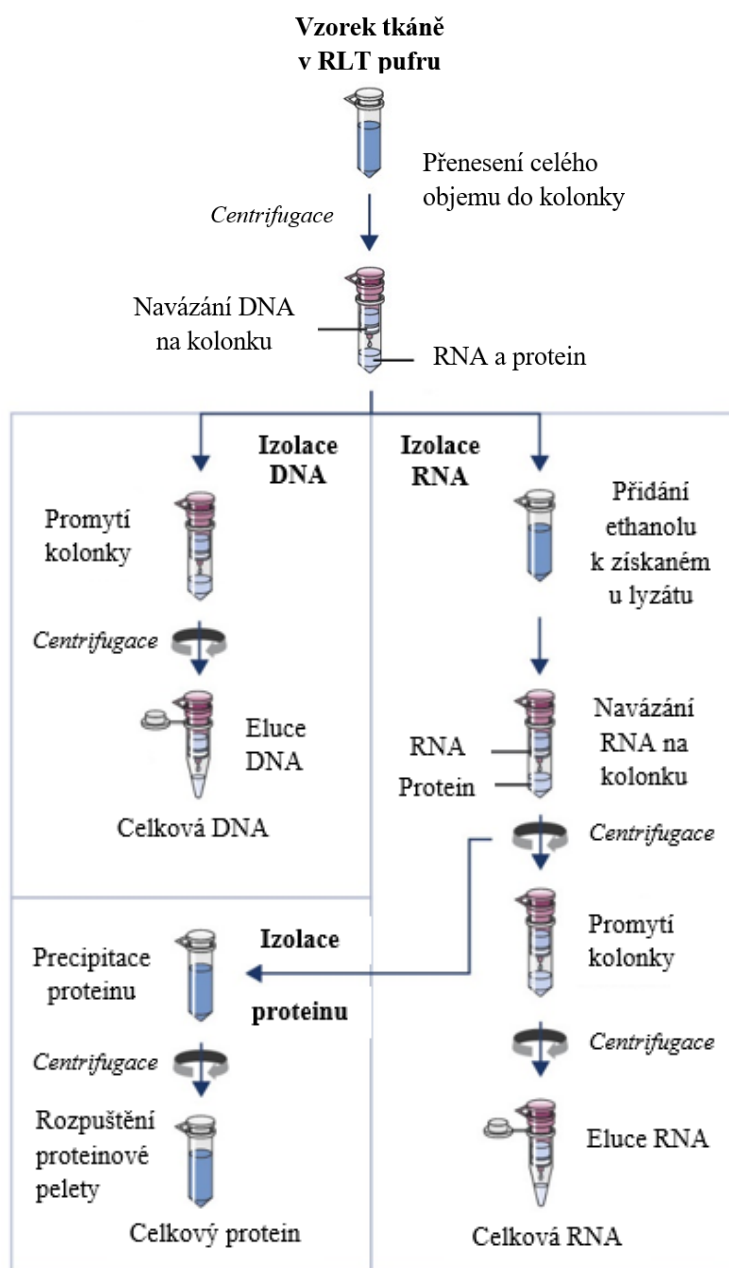
Pro izolaci bylo použito přibližně 20–30 mg tkáně, jež byla v porcelánové misce s tloučkem za přítomnosti tekutého dusíku homogenizována na jemný prášek. Před samotnou homogenizací byla miska s tloučkem a veškeré nástroje řádně nachlazeny tekutým dusíkem, aby se předešlo degradaci nukleových kyselin. Po dokončení homogenizace byl získaný prášek přenesen co nejrychleji do pufru.

Typ pufru závisí na zvolené izolační metodě. V případě izolačního kitu AllPrep® byl získaný prášek přenesen do 600 µl lyzačního RLT pufru, který obsahuje přídavek β-merkaptoethanolu (10 µl na 1 ml RLT pufru). RLT pufr svým složením podpoří lýzu buněk a zároveň i denaturaci proteinů (včetně nukleáz a proteáz). Druhou možností je izolace pomocí Trizolu, kdy se vzorek přenáší právě do 1000 µl Trizolu® (TRIzol™ Reagent). Po přenesení nadrcené tkáně do roztoku pufru byla vždy provedena homogenizace pomocí pipety. Takto zpracované vzorky lze ihned použít pro další analýzu, nebo uložit do mrazáku do -80 °C, kde mohou být skladovány před izolací nukleových kyselin po dobu jednoho měsíce.



#### 4.3.1.1 Izolace kitem AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit (QIAGEN)

Kit AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit je navržen přímo pro izolaci a purifikaci genomové DNA, celkové RNA a proteinu z tkáně, či z buněčné linie. Izolace pomocí tohoto kitu je založena na vazbě nukleových kyselin na silikátové kolonky. Po purifikaci je nukleová kyselina z kolonky vymyta a lze ji využít pro další analýzu. Postup izolace pomocí tohoto kitu probíhal při laboratorní teplotě a jeho schéma je znázorněno na **Obrázku č. 14**.



**Obrázek 14:** Schéma izolačního procesu pomocí kitu AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit.  
Upraveno dle *User Manual (Qiagen AllPrep DNA/RNA Mini Handbook 11/2020)*.

Před samotnou izolací RNA byl lyzát homogenizován stočením na centrifuze (3 min,  $21\,924 \times g$ ), poté byla provedena izolace RNA, kdy byl supernatant ze stočeného vzorku nejprve přenesen do kolonky pro izolaci DNA (AllPrep DNA Spin Column), která byla umístěna ve sběrné zkumavce. Po přefiltrování byl vzorek stočen (1 min,  $14\,031 \times g$ ) a centrifugace byla opakována, dokud nebyla přefiltrována všechna tekutina. Kolonka s navázanou DNA byla uchována při  $4\,^{\circ}\text{C}$  pro pozdější purifikaci DNA.

K získanému filtrátu bylo napipetováno  $430\,\mu\text{l}$  99% ethanolu a po promísení špičkou bylo  $430\,\mu\text{l}$  přeneseno do kolonky pro izolaci RNA (RNeasy Spin Column). Kolonka byla opět centrifugována (30 s,  $14\,031 \times g$ ) a získaný filtrát byl přenesen do čisté mikrozukavky a uchován při  $4\,^{\circ}\text{C}$  pro pozdější purifikaci proteinu. Tento krok byl opakován pro přefiltrování veškerého filtrátu s přidaným ethanolem. Poté následovalo promývání kolonky s navázanou RNA, nejprve přidavkem  $700\,\mu\text{l}$  RW1 pufru a centrifugací (30 s,  $14\,031 \times g$ ). Následně byla kolonka promývána  $500\,\mu\text{l}$  RPE pufru a centrifugací (30 s,  $14\,031 \times g$ ), tento krok byl opakován s delší centrifugací (2 min,  $14\,031 \times g$ ). Filtrát byl po každém stočení opatrně vylit. Pro úplné odstranění promývacího roztoku byla kolonka centrifugována (1 min,  $21\,924 \times g$ ). V posledním kroku byla kolonka přendána do čisté sběrné zkumavky a bylo přidáno  $30\,\mu\text{l}$  ultračisté vody bez nukleáz (NFW) přímo na filtr a kolonka byla opět centrifugována (1 min,  $14\,031 \times g$ ) pro uvolnění RNA ze silikátového filtru. Pro maximalizaci výtěžku byl tento promývací krok opakován, nicméně před centrifugací byla NFW inkubována na membráně 1 minutu. Získaná RNA v  $60\,\mu\text{l}$  filtrátu byla uschována při  $-80\,^{\circ}\text{C}$ .

Purifikace DNA byla provedena na kolonce určené k její purifikaci (AllPrep DNA Spin Column), do které bylo přidáno  $500\,\mu\text{l}$  AW1 pufru a následně byla provedena centrifugace (30 s,  $9744 \times g$ ). Získaný filtrát byl vylit a stejný postup byl opakován i pro pufr AW2 s centrifugací (1 min,  $21\,924 \times g$ ). Samotná kolonka v čisté sběrné zkumavce byla centrifugována (1 min,  $21\,382 \times g$ ) pro odstranění promývacího pufru. V posledním kroku byla kolonka přendána do čisté sběrné zkumavky a přímo na membránu přidáno  $50\,\mu\text{l}$  EB pufru zahřátého na  $70\,^{\circ}\text{C}$  a po dvouminutové inkubaci byla kolonka centrifugována (1 min,  $9744 \times g$ ), aby došlo k uvolnění navázané DNA. Tento krok byl 1x zopakován pro maximalizaci výtěžku. Získaná DNA je uchovávána pro budoucí studie při  $-20\,^{\circ}\text{C}$ .

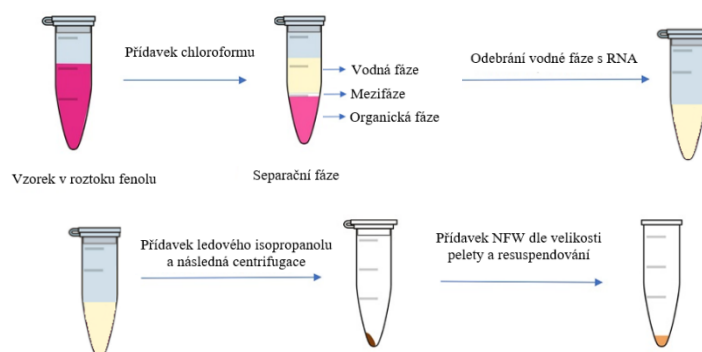
V posledním kroku byl izolován protein, a to z filtrátu získaného po přidavku ethanolu a po přefiltrování přes kolonku určenou k izolaci RNA. K filtrátu bylo přidáno 1000  $\mu$ l APP pufru, roztok byl řádně promíchán pomocí vortexu a inkubován 10 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl filtrát centrifugován (10 min,  $21\,924 \times g$ ) a po odlití supernatantu bylo k peletě přidáno 500  $\mu$ l 70% ethanolu. Vzorek byl opět centrifugován (1 min,  $21\,924 \times g$ ) a po odstranění supernatantu byla peleta sušena 5–10 minut. K vysušené peletě bylo v závislosti na její velikosti přidáno 100–200  $\mu$ l 5% SDS. Peleta byla opakovaným nasáváním a vypouštěním rozpuštěna v roztoku SDS. Po homogenizaci byl roztok řádně promíchán na vortexu a inkubován 5 minut při teplotě 95 °C, aby se protein kompletně rozpustil. Po ochlazení na pokojovou teplotu byl vzorek centrifugován (1 min,  $21\,924 \times g$ ), aby se odstranily nerozpustné zbytky. Získaný supernatant obsahující proteiny byl přenesen do čisté mikrozkušavky a uchováván spolu s peletami při -20 °C.

#### **4.3.1.2 Izolace celkové RNA Trizolem**

Tato izolační metoda je založena na principu separace pomocí dvou fází (organické a vodné) a je vhodná právě pro vzorky, u kterých se očekává nízká koncentrace RNA. Při izolaci se využívá Trizol (roztok fenolu a guanidiniethiokyanátu), jenž zajišťuje udržení integrity RNA během celého procesu izolace (od homogenizace tkáně a lýzy buněk až po purifikaci). Nicméně Trizol je pouze monofázní roztok, tudíž se pro izolaci RNA využívá v kombinaci s chloroformem.

Po přidavku chloroformu (200  $\mu$ l) byl vzorek řádně promíchán na vortexu a inkubován 3 minuty při laboratorní teplotě. Po dokončení inkubace byla provedena centrifugace (15 min,  $14\,031 \times g$ , 4 °C) pro oddělení vodné fáze obsahující RNA, mezifáze s DNA a organické fáze obsahující proteiny. Vodná fáze obsahující RNA byla odebrána do čisté mikrozkušavky. Při odebírání vodné fáze je nutné pipetovat opatrně a nenasát mezifázi obsahující DNA, jinak by došlo ke kontaminaci. Do zkumavky s vodnou fází bylo přidáno stejné množství ledového isopropanolu a vzorek byl inkubován 10 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci následovala centrifugace (15 min,  $14\,031 \times g$ , 4 °C). Po odlití supernatantu byla získaná peleta promyta 500  $\mu$ l 70% ethanolu a vzorek byl opět centrifugován (5 min,  $14\,031 \times g$ ). Po centrifugaci byl opět odebrán supernatant a peleta byla sušena v suchém bloku při 60 °C. Suchá peleta byla resuspendována v NFW a po řádném promíchání byl vzorek uložen do mrazáku do -80 °C. Tímto způsobem byla

izolována RNA z velmi malých vzorků tkání, kde byl očekáván nízký výtěžek. Zjednodušené schéma izolačního procesu Trizolem je popsáno na **Obrázku č. 15**.



**Obrázek 15: Proces izolace Trizolem.** Převzato a upraveno dle (Lu a Rothenberg 2018).

#### 4.3.2 Měření koncentrace RNA

Pro měření koncentrace RNA byl využit komerčně dodávaný kit Quant-iT<sup>TM</sup> RiboGreen<sup>®</sup> RNA Reagent Kit. Součástí tohoto kitu je TE pufr (20× koncentrovaný Tris-EDTA), RNA standard (16S a 23S rRNA z *E. coli*) a fluorescenční barvivo RiboGreen, které se váže na získanou RNA. Samotným principem této metody je měření intenzity fluorescence vzorků, přičemž koncentrace RNA je vypočtena na základě kalibrační křivky standardu RNA.

Veškerá příprava vzorků a pracovních roztoků na měření koncentrace RNA byla prováděna v laminárním boxu za použití sterilních nástrojů a plastů na vychlazených stojancích. Nejprve byl naředěn TE pufr 20× v NFW. Tento pufr byl následně použit k naředění fluorescenční barvy RiboGreen (200× v TE pufru) a RNA standardu o koncentraci 100 µg/ml v TE pufru. Při práci s fluorescenční barvou bylo dbáno na co nejvyšší ochranu před světlem, aby nedošlo k její degradaci. Pracovní roztoky byly rozpipetovány na měřicí destičku dle **Tabulky č. 4**. Po přípravě pracovních roztoků byla naředěna i analyzovaná RNA, a to 200× opět přídatkem TE pufru.

**Tabulka 4:** Ředící řada standardních roztoků pro měření koncentrace RNA pomocí Quant-iT<sup>TM</sup> RiboGreen<sup>®</sup> RNA Reagent Kit

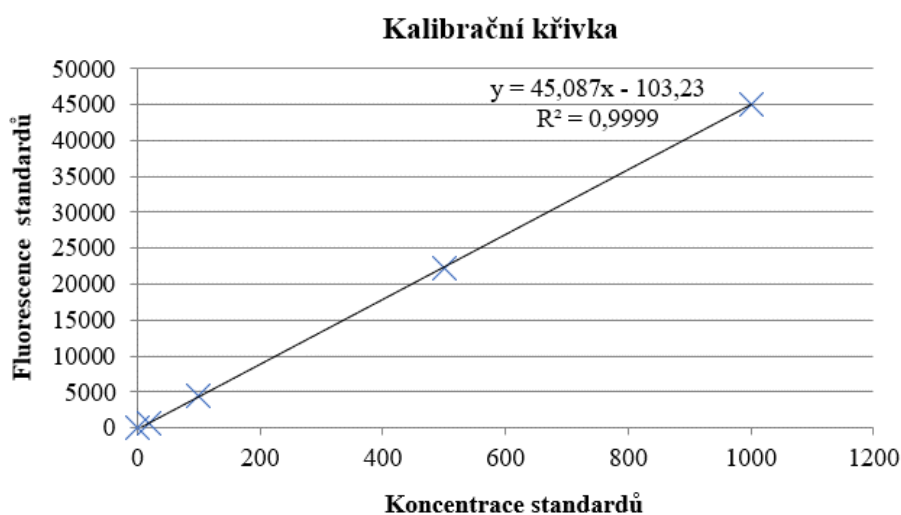
| Pozice na destičce |            | 1×TE<br>[µl] | RNA<br>standard<br>2 µg/ml [µl] | Barvivo<br>RiboGreen<br>[µl] | Koncentrace<br>RNA<br>[ng/ml] |
|--------------------|------------|--------------|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| A1                 | B1         | 0            | 100                             | 100                          | 1000                          |
| A2                 | B2         | 50           | 50                              |                              | 500                           |
| A3                 | B3         | 90           | 10                              |                              | 100                           |
| A4                 | B4         | 98           | 2                               |                              | 20                            |
| A5 (blank)         | B5 (blank) | 100          | 0                               |                              | 0                             |

Do každé jamky od pozice A6 bylo postupně rozpipetováno 90 µl 1× TE pufru, 10 µl 200× ředěné RNA a 100 µl RiboGreen barvy, která byla pipetována těsně před měřením, aby se předešlo její degradaci. Každý vzorek i jednotlivé standardní roztoky byly pipetovány v duplikátech pro získání co nejpresnějších výsledků.

Takto připravená destička byla na 10 minut umístěna do tmy na třepačku, pro zajištění řádného promísení všech reakčních komponent v jednotlivých jamkách. Následně bylo provedeno samotné měření na spektrofotometru Infinite® M200 (Tecan). Intenzita fluorescence byla vyhodnocena při vlnové délce excitace 480 nm a vlnové délce emise 520 nm. Pro výpočet koncentrace RNA byl nejprve sestaven graf regresní přímky ředěných standardů s rovnicí, ze které byly následně vypočítány koncentrace jednotlivých vzorků. Příklad grafu a příslušných koncentrací jednotlivých RNA standardů je znázorněna v **Tabulce č. 5** a na **Obrázku č. 16**.

**Tabulka 5:** Koncentrace RNA standardů pro sestavení grafu regresní přímky

| Koncentrace RNA standardů | Fluorescence RNA standardů |
|---------------------------|----------------------------|
| 1000                      | 45104,5                    |
| 500                       | 22183,5                    |
| 100                       | 4485,5                     |
| 20                        | 750,5                      |
| 0                         | 0                          |



**Obrázek 16:** Kalibrační křivka s rovnicí pro výpočet koncentrace RNA ve vzorcích.

### 4.3.3 Syntéza cDNA

Ze získaných vzorků byla následně provedena syntéza cDNA. Komplementární DNA (cDNA) je syntetizována procesem reverzní transkripce dle příslušného RNA templátu, ke kterému je takto vytvořená DNA komplementární. V rámci předkládané diplomové práce byla syntéza cDNA provedena s využitím komerčně dodávaného kitu RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit.

Veškeré manipulace s RNA a reagensii z kitu byly prováděny v laminárním boxu na chladicích stojancích. Pro samotnou přípravu cDNA bylo použito 0,5 µg RNA. Množství RNA přenesené do zkumavky bylo u konkrétního vzorku vždy vypočteno na základě koncentrace. Dále bylo do zkumavky napipetováno 1 µl Random Hexamer Primeru (100 µM) a NFW tak, aby finální objem roztoku činil 14 µl. Pro odhalení případné kontaminace byla syntetizována i tzv. Non-template control (NTC), které obsahovala pouze 1 µl Random Hexamer Primeru a 13 µl NFW. S touto negativní kontrolou se pracovalo stejným způsobem, jako se vzorky.

Každý vzorek byl promíchán a stočen na stolní minicentrifuze. Po centrifugaci následovala inkubace při 70 °C po dobu 5 minut, pro rozvolnění sekundárních struktur RNA. Po inkubaci byly vzorky ochlazeny na chladicím stojánku a stočeny na minicentrifuze. Do každého vzorku včetně negativní kontroly bylo přidáno 7 µl reakční směsi, která byla připravena dle **Tabulky č. 6**.

**Tabulka 6:** Složení reakční směsi pro syntézu cDNA (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit)

| Reagencie                          | Objem [µl] |
|------------------------------------|------------|
| 5× Reaction Buffer                 | 4 µl       |
| 10 mM dNTP Mix                     | 2 µl       |
| RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl) | 1 µl       |

Po přidání reakční směsi byly jednotlivé zkumavky opět promíchány a stočeny na minicentrifuze. Takto připravené vzorky byly inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě a poté ochlazeny na chladicím stojánku a znovu centrifugovány. Po tomto kroku byly z každého vzorku odebrány 2 µl jako negativní kontroly samotných vzorků. Do všech vzorků kromě negativních kontrol vzorků byl přidán 1 µl reverzní transkriptázy RevertAid (200 U/µl). Celkový objem reakční směsi tedy činil 20 µl a její přesné složení popisuje **Tabulka č. 7**.

**Tabulka 7:** Finální složení reakční směsi pro syntézu cDNA

| Výsledná reakční směs               | Finální koncentrace |
|-------------------------------------|---------------------|
| 100 µM Random Hexamer Primer        | 50 µM               |
| 5× Reaction Buffer                  | 1×                  |
| 10 mM dNTP Mix                      | 1 mM                |
| RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ µl) | 20 U                |
| RevertAid (200 U/µl)                | 200 U               |
| RNA                                 | 0,025 µg/µl         |
| NFW                                 |                     |

Posledním krokem byla inkubace vzorků, nejprve 10 minut při 25 °C a poté 60 minut při teplotě 42 °C. Tato teplota je optimální pro aktivitu použité reverzní transkriptázy, která zároveň funguje jako RNáza H a štěpí tedy RNA v hybridních cDNA-RNA řetězcích. Syntéza cDNA byla zakončena inkubací vzorků 10 minut při teplotě 70 °C. Po dokončení všech kroků byly vzorky uloženy při -20 °C.

#### 4.3.3.1 Syntéza cDNA pro stanovení exprese miRNA

Syntéza cDNA pro následné stanovení exprese miR-665 a U6-snRNA ve vybraných vzorcích byla opět provedena pomocí reverzní transkripce s využitím kitu TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit. Pro syntézu cDNA byly nejprve vzorky RNA naředěny na koncentraci 2 ng/µl. Takto připravené vzorky byly po 2,5 µl přidány k 5 µl mixu. Výsledné složení reakční směsi je popsáno v **Tabulce č. 8**. Samotná syntéza cDNA probíhala v termocycleru dle následujícího programu: 30 minut při 16 °C; 30 minut při 42 °C; 5 minut při 85 °C. Po dokončení syntézy byl vzorek ochlazen na 4 °C a uložen do mrazáku do -20 °C.

**Tabulka 8:** Složení reakční směsi pro syntézu cDNA pro stanovení exprese miRNA

| Výsledná reakční směs                        | Objem [µl] |
|--|------------|
| 10× Reverse Transcription Buffer             | 0,750      |
| 10mM dNTPs (with dTTP)                       | 0,750      |
| RNase Inhibitor, 20 U/µL                     | 0,095      |
| MultiScribe Reverse Transcriptase, 50 U/µL   | 0,500      |
| Nuclease-free water                          | 2,530      |
| 20× RT Specific Primers pro příslušnou miRNA | 0,375      |
| <b>Celkový objem mixu</b>                    | <b>5,0</b> |
| <b>Celkový objem RNA</b>                     | <b>2,5</b> |

#### 4.3.3.2 Kontrola kvality cDNA

Pro ověření úspěšnosti syntézy cDNA a pro případné odhalení kontaminace genomovou DNA byla provedena amplifikace části sekvence tzv. housekeepingového genu *UBC* pro ubiquitin C s následným elektroforetickým vyhodnocením. Tento gen je pro buňku esenciální, tudíž by měl být exprimován ve všech tkáních. Pro označení budoucí amplifikované sekvence byly použity dva primery přední (forward) a zadní (reverse), které byly navrženy tak, aby zahrnovaly první (forward primer) a druhý exon (reverse primer) *UBC* genu. Pokud došlo k amplifikaci pouze u cDNA, výsledný produkt byl tvořen dvěma exony a jeho celková délka čítala 190 bp jak bylo dříve popsáno (*Souček et al. 2005*). Pokud by byla přítomna kontaminace genomovou DNA, pak by došlo k syntéze mnohem delšího produktu (1009 bp) zahrnujícího intronovou část.

Veškerá manipulace s cDNA probíhala v pre-PCR laboratoři za použití sterilních nástrojů a plastů. Vzorky cDNA byly během přípravy na amplifikaci umístěny na chladicím stojánku, aby se předešlo jejich degradaci. Pro PCR reakci byly využity chemikálie firmy Top-Bio a primery firmy Invitrogen. Samotná amplifikační reakce probíhala v 96jamkové plastové destičce, do každé jamky bylo napipetováno 9,5  $\mu$ l reakční směsi (mixu) a 0,5  $\mu$ l cDNA. Finální objem reakční směsi tedy činil 10  $\mu$ l a její přesné složení popsáno v **Tabulce č. 9**.

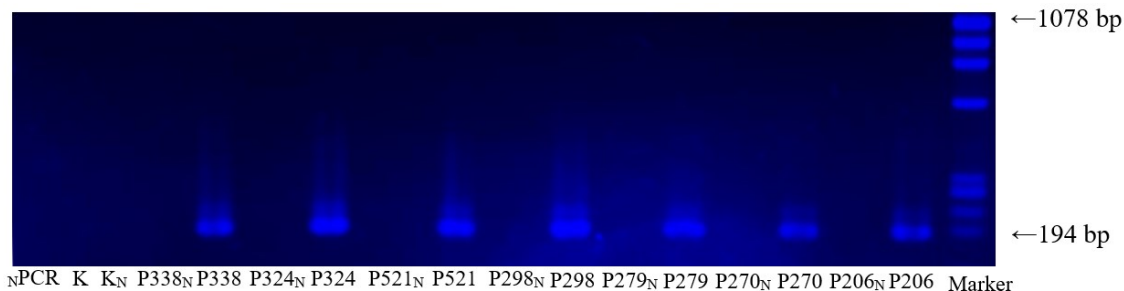
**Tabulka 9:** Výsledné složení reakční směsi pro PCR

| Složka                                    | Objem [ $\mu$ l] | Finální koncentrace     |
|---|------------------|-------------------------|
| NFW                                       | 6,9              | -                       |
| 10 $\times$ Taq pufr bez Mg <sup>2+</sup> | 1                | 1x                      |
| 25 mM MgCl                                | 0,4              | 1 mM                    |
| PCR dNTP mix (10 mM)                      | 0,2              | 0,2 mM                  |
| primery pro UBI (10 $\mu$ M)              | 2 $\times$ 0,25  | 2 $\times$ 0,25 $\mu$ M |
| Taq Purple polymeráza (1 U/ $\mu$ l)      | 0,5              | 0,5 U/ $\mu$ l          |
| cDNA                                      | 0,5              | -                       |

Samotná amplifikace probíhala v termocycleru (GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700), nejprve 5 minut při 94 °C a poté 38 cyklů: 30 s při 94 °C, 30 s při 64 °C a 30 s při 72 °C. Po dokončení cyklů následovalo 5 minut při 72 °C a po uplynutí této doby byla teplota snížena na 10 °C. Takto získaný produkt byl podroben elektroforetické separaci pro ověření případné kontaminace vzorků genomovou DNA.



Elektroforetická separace je založena na odlišné průchodnosti biomolekul elektroforetickým gelem. Průchodnost molekul je ovlivněna především jejich nábojem, velikostí a konformací. Molekula DNA má díky fosfátovým zbytkům záporný náboj a putuje tedy od katody k anodě. Pro výrobu elektroforetického gelu byla zvolena 3% (w/v) agarosa, která byla za použití mikrovlnné trouby rozpuštěna v 0,5× ředěném TBE (tris-borát-EDTA) pufru. Takto připravený gel byl vlit do speciální formy a po umístění hřebenu (ladder) se nechal vychladnout. Ztuhlý gel byl přenesen do elektroforetické vany. Do žlábků, vytvořených pomocí hřebenu bylo vždy pipetováno 10  $\mu$ l vzorku. Pro určení velikosti vzniklých fragmentů byl použit marker  $\phi$  174 DNA –Hae III Digest (New England Biolabs), který byl do zvolených žlábků pipetován po 8  $\mu$ l. Elektroforéza probíhala přibližně půl hodiny při 100 mA (120 V). Po dokončení separace byla provedena vizualizace rozdělených fragmentů pomocí ethidium bromidu. Gel byl na 10 minut ponořen do roztoku ethidium bromidu, poté byl opláchnut v destilované vodě a vyfotografován pomocí Odyssey® Fc zobrazovacího systému. Příklad vizualizace získaných produktů genu *UBI* je znázorněn na **Obrázku č. 17**. Tímto způsobem byla ověřena čistota a kvalita všech vzorků použitých



**Obrázek 17: Vizualizace produktů genu *UBI*.** Pro identifikaci velikosti fragmentů byl použit DNA marker ( $\phi$  174 DNA – Hae III Digest marker). Každý vzorek byl na gel nanesen i se svou negativní kontrolou (N). Pro ověření průběhu PCR reakce byla na gel nanesena také negativní kontrola (nPCR) a pro kontrolu syntézy cDNA kontrolní vzorek K.

v diplomové práci.

#### 4.3.4 Stanovení genové exprese *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* ve vzorcích cDNA

Ke stanovení genové exprese na vzorcích cDNA byla využita kvantitativní PCR reakce (qPCR) v reálném čase, která sleduje přírůstek amplifikované DNA v každém cyklu na základě intenzity fluorescence speciálních sond. Sondy jsou krátké DNA fragmenty komplementární k určité sekvenci příslušného genu a skládají se z tzv. reportéru s fluorescenční značkou a zhášecí (quencher), jenž blokuje fluorescenční signál. Díky exonukleázové aktivitě HOT FIREPol® polymerázy dochází v průběhu amplifikace komplementárního úseku cDNA ke štěpení sondy, a tedy i k oddělení reportéru

od zhášeče a emisi fluorescence. Cyklus, ve kterém došlo k amplifikaci příslušného úseku cDNA je detekován na základě zvýšení intenzity fluorescence nad prahovou hodnotu (threshold value) a je vyjádřen pomocí Ct hodnoty tedy cyklem, při kterém k tomuto zvýšení intenzity dochází.

Měření genové exprese na úrovni transkriptu bylo nejprve provedeno u tzv. housekeepingových genů (*MRPL19*, *EIF2B1*, *IPO8* pro karcinom prsu a *UBC*, *PPIA*, *YWHAZ* pro karcinom ovaria), jež byly při statistickém zpracování využity jako referenční geny pro normalizaci exprese kandidátních genů. Stanovení genové exprese bylo provedeno v každé kohortě pacientek celkem u 3 kontrolních a 3 kandidátních genů, které jsou vypsány v **Tabulce č. 10**.

**Tabulka 10:** Použité Taqman sondy pro referenční a kandidátní geny

| Referenční geny   | Taqman Assay  | Délka amplikonu | Referenční sekvence transkriptu | Lokalizace v exonech genu |
|---|---------------|-----------------|---------------------------------|---------------------------|
| <b>MRPL19</b><br><i>Mitochondrial ribosomal protein L19</i>                       | Hs00608519_m1 | 72              | NM_014763.3                     | 2–3                       |
| <b>EIF2B1</b><br><i>Eukaryotic translation initiation factor 2B subunit alpha</i> | Hs00426752_m1 | 75              | NM_001414.3                     | 4–5                       |
| <b>IPO8</b><br><i>Importin 8</i>  | Hs00183533_m1 | 71              | NM_001190995.1                  | 16–17                     |
| <b>PPIA</b><br><i>Peptidylprolyl isomerase A</i>                                  | Hs99999904_m1 | 98              | NM_001300981.1                  | 5                         |
| <b>UBC</b><br><i>Ubiquitin C</i>  | Hs00824723_m1 | 71              | NM_021009.6                     | 1–2                       |
| <b>YWHAZ</b><br><i>Tyrosine 3-monooxygenase activation protein ζ polypeptide</i>  | Hs03044281_g1 | 106             | NM_001135700.1                  | 4–5                       |
| Kandidátní geny   | Taqman Assay  | Délka amplikonu | Referenční sekvence transkriptu | Lokalizace v exonech genu |
| <b>TRIP6</b><br><i>Thyroid hormone receptor interactor 6</i>                      | Hs00377979_m1 | 62              | NM_003302.2                     | 7–8                       |
| <b>CPS1</b><br><i>Carbamoyl-phosphate synthase 1</i>                              | Hs00919490_m1 | 89              | NM_001122633.2                  | 10–11                     |
| <b>ABCC3</b><br><i>ATP binding cassette subfamily C member 3</i>                  | Hs00358656_m1 | 98              | NM_003786.3                     | 8–9                       |

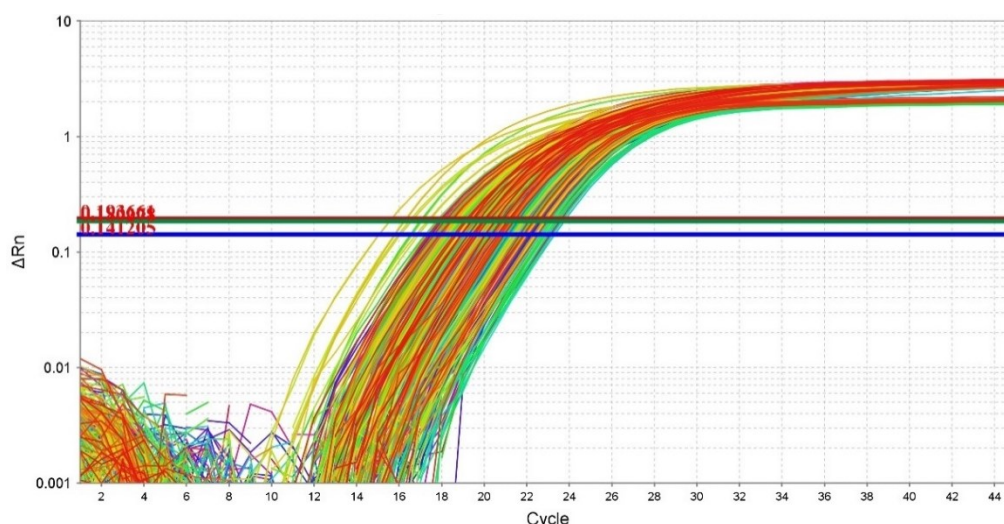
Pro qPCR reakci byly použity primery a fluorescenční sondy TaqMan® Gene Expression Assays (Life Technologies) a mix s DNA polymerázou HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus ROX (Solis BioDyne). Vlastní reakce probíhala na 384jamkové destičce a vzorky byly pipetovány v duplikátech. Do každé jamky byly napipetovány 2 µl 8× ředěné cDNA a 3 µl reakční směsi. Reakční směs byla připravena v příslušném množství pro každý gen zvlášť, její přesné složení je vyjádřeno v **Tabulce č. 11**.

**Tabulka 11:** Složení reakční směsi pro real-time PCR

| Složka                                    | Objem [µl] |
|---|------------|
| NFW                                       | 1,75       |
| 5× HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (ROX) | 1          |
| TaqMan Gene® Expression Assay (20×)       | 0,25       |
| 8× ředěná cDNA                            | 2          |

Pro důkladné promíchání všech komponent byla takto připravená destička centrifugována 5 minut při 1500 otáčkách pomocí PCR plate Spinner (VWR). Po centrifugaci byla destička umístěna do přístroje ViiA7 (Applied Biosystems) a bylo provedeno měření genové exprese dle následujícího programu: 2 minuty při 50 °C; 10 minut při 95 °C ; 45 cyklů 15 sekund při 95 °C a 1 minutu při 60 °C.

Po dokončení reakce byly porovnány Ct hodnoty mezi duplikáty, v případě rozdílu o více než 0,5 cyklu bylo měření opakováno. Pro kontrolu průběhu reakce byl spolu se vzorky měřen směsný kalibrátor (8× ředěná ekvimolární směs 10 cDNA z analyzovaných vzorků) a negativní kontrola sestávající z použití NFW místo vzorku cDNA. Na **Obrázku č. 18** je uveden příklad amplifikačního záznamu real-time PCR pro gen *ABCC3*.



**Obrázek 18:** Amplifikační křivka qPCR pro gen *ABCC3*. Osa X značí jednotlivé cykly PCR reakce a osa Y udává intenzitu fluorescence v relativních jednotkách (r.u). Červeně označená číselná hodnota udává Ct hodnotu, tedy cyklus, ve kterém intenzita fluorescence překročila prahovou hodnotu.

#### 4.3.5 Stanovení genové exprese miRNA

K zavedení metodiky stanovení exprese miRNA-665 a referenční U6-snRNA ve vzorcích nádorové tkáně vyselektovaného setu karcinomů prsu ( $n = 30$ ) byla využita kvantitativní PCR reakce (qPCR) v reálném čase. Jako negativní kontrola byl použit vzorek, kde byla místo cDNA pipetována NFW. Vlastní qPCR v reálném čase byla provedena na přístroji RotorGene 6000 (Corbett Life Science) s využitím 72pozicového rotoru. Každý vzorek se skládal z 6  $\mu$ l mixu, do kterého byly následně přidány 4  $\mu$ l příslušného vzorku či NFW v případě negativní kontroly. Reakční směs byla připravena v příslušném množství pro každou miRNA zvlášť, její přesné složení je vyjádřeno v **Tabulce č. 12**. Vlastní PCR reakce probíhala za následujících podmínek: 2 minuty, 50 °C; 10 minut, 95 °C; 45 cyklů: 15 minut, 95 °C a 1 minuta, 60 °C

**Tabulka 12:** Složení reakční směsi pro stanovení exprese miRNA pomocí real-time PCR

|  | Objem [ $\mu$ l] |
|--|------------------|
| NFW  | 0,5              |
| TaqMan Universal PCR Master Mix II (2 $\times$ ) | 5,0              |
| TaqMan microRNA Expression Assay (20 $\times$ )  | 0,5              |
| 6 $\times$ ředěná cDNA                           | 4,0              |

Všechny vzorky byly měřeny v duplikátech. Pro kontrolu kvality vzorků vybraných pro stanovení exprese miRNA-665 a U6-snRNA byla využita qPCR reakce směšného kalibrátoru, který byl připraven smícháním 15 náhodně zvolených vzorků ze setu. V případě rozdílu většího než 0,5 cyklu mezi duplikáty bylo stanovení zopakováno.

V rámci stanovení genové exprese miRNA byla změřena exprese referenční U6-snRNA, která byla použita pro normalizaci exprese miRNA-665. Samotná analýza byla provedena opět pomocí qPCR jako u výše zmíněných kandidátních a referenčních genů. I v tomto případě byly použity primery a fluorescenční sondy TaqMan Gene Expression Assays (**Tabulka č. 13**) spolu s TaqMan Universal Master Mixem II. Použitá cDNA byla po 2  $\mu$ l byla přidána ke 3  $\mu$ l mixu. Výsledné složení reakční směsi je popsáno v následující **Tabulce č. 14**. Samotná reakce probíhala ve 384jamkové destičce s využitím přístroje ViiA7 (Applied Biosystems, Waltham) dle stejného programu jako amplifikace kandidátních a referenčních genů.

**Tabulka 13:** Použité TaqMan sondy pro referenční a kandidátní miRNA

| Referenční miRNA                | Taqman Assay  | Referenční sekvence transkriptu | Kontrolní sekvence                                 |                           |
|---------------------------------|---------------|---------------------------------|--|---------------------------|
| U6-snRNA                        | 001093        | NR_002752                       | CGCAAGGATGACACGCA<br>AATTCGTGAAGCGTTCCA<br>TATTTTT |                           |
| Kandidátní miRNA                | Taqman Assay  | Referenční sekvence transkriptu | Délka amplikonu                                    | Lokalizace v exonech genu |
| miRNA-665<br><i>hsa-mir-665</i> | Hs06637014_s1 | NR_030617.1                     | 66   | 1                         |

**Tabulka 14:** Výsledné složení reakční směsi pro miRNA qPCR

| Složka  | Objem [ $\mu$ l] |
|---|------------------|
| RNAase free water                               | 0,250            |
| TaqMan microRNA Expression Assay (20 $\times$ ) | 0,250            |
| TaqMan Universal Mastermix II (2 $\times$ )     | 2,500            |
| <b>Celkový objem mi<math>\times</math>u</b>     | <b>3</b>         |
| <b>Celkový objem cDNA</b>                       | <b>2</b>         |

#### 4.3.6 Statistické vyhodnocení genové a miRNA exprese ve vzorcích karcinomu ovarii a karcinomu prsu

Jako nejčastěji používaný způsob stanovení přežívání byla hodnocena v případě ovariálního karcinomu doba od provedení operace do progresu, relapsu nebo úmrtí v měsících tzv. Time to Progression (TTP). V případě karcinomu prsu byly rovněž sbírány údaje o expresi receptorů (estrogenový receptor, progesteronový receptor, HER2) a proliferačního markeru Ki-67. Přežívání pacientek s karcinomem prsu bylo hodnoceno jako doba od operace do nástupu progresu, relapsu či úmrtí tedy jako tzv. přežívání bez progresu (PFS) v měsících a také jako celkové přežívání, tedy doba od operace do poslední kontroly či úmrtí tzv. Overall Survival (OS).

Pro statistické hodnocení genové exprese byly použity Ct hodnoty naměřené pro jednotlivé kandidátní i referenční geny, či miRNA. Hodnocení rozdílu exprese sledovaných genů v nádorové tkáni oproti nenádorové tkáni bylo provedeno pomocí softwaru REST2009 (Qiagen), který pracuje přímo s hodnotami Ct. V rámci normalizace genové a miRNA exprese byla využita metoda  $\Delta\Delta Ct$ , která je založena na předpokladu obdobné efektivity amplifikace referenčního i kandidátního genu. Normalizace metodou  $\Delta\Delta Ct$  byla provedena dle následujícího vzorce:

$$\Delta Ct = Ct(\text{vzorek}) - Ct(\text{průměr referenčních genů})$$

$$2^{-(\Delta Ct)} = \text{normalizované Ct}$$

Hodnota relativní exprese cílového genu se odvíjí od vypočteného poměru, kdy s klesající hodnotou tohoto poměru narůstá hodnota relativní exprese analyzovaných genů. Takto získaná a upravená data byla zpracována pomocí statistického softwaru SPSS v16.0 pro porovnání hladin genové exprese s klinicko-patologickými parametry.

Prvním krokem statistické analýzy byl test normality, který se využívá pro zhodnocení distribuce normalizovaných expresí kandidátních genů. V našem případě byla normalita ověřena pomocí Kolmogorov-Smirnova a Shapiro-Wilkova testu. Vzhledem k tomu, že rozdělení dat neodpovídalo normálnímu rozdělení, byly provedeny neparametrické testy signifikance, které se používají pro zjištění korelace (respektive vztahu) mezi vybranými daty. Korelace mezi expresí jednotlivých kandidátních genů a expresí mezi miRNA a cílovým genem byla ověřena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Následně byla vyhodnocena korelace mezi klinickými daty a expresí kandidátních genů pomocí Kruskal-Wallisova a Mann-Whitneyova testu pro expresní data a faktoriální veličiny.

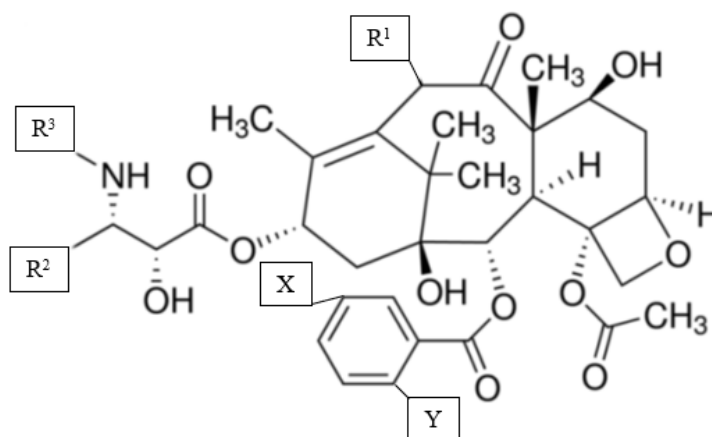
V rámci statistického zpracování byla provedena i analýza přežívání pacientek, pro kterou byla využita Kaplan-Meierova metoda a Log Rank test, do kterých byly použity hodnoty expresí rozdělené dle mediánu a doby do progresu onemocnění. Všechny výsledky s hladinou významnosti  $p < 0,05$  byly považovány za statisticky významné. Statisticky významné výstupy byly podrobeny tzv. FDR (false discovery rate) korekci dle (*Benjamini a Hochberg 1995*) (dále B-H korekce). Pro B-H korekci jsou zapotřebí všechny p-hodnoty pro daný typ analýz seřazené vzestupně dle velikosti a významnost je stanovena na hladině  $q = 0,05$ . Vlastní korekce je provedena s použitím následujícího vzorce:

$$P_i \leq (i / m) \cdot q \quad (2)$$

Hodnota  $m$  představuje celkový počet hypotéz a  $i$  pořadí hypotézy v tabulce. Pokud je p-hodnota menší než výsledná hodnota  $q$ , je statistický výsledek i po korekci považován za signifikantní (*Benjamini and Hochberg, 1995*). Metody použité při práci s klinickými vzorky pacientek byly na Odd. Toxikogenomiky již zavedeny a publikovány (*Elsnerova et al. 2016; Hlaváč et al. 2013; Hubackova et al. 2012*). Nově zavedenou technikou bylo stanovení exprese miRNA v nádorových vzorcích. Pro hodnocení exprese miRNA a vztahů se sledovanými klinicko-patologickými údaji a genovým expresním profilem byly použity stejné způsoby, jako v případě hodnocení genové exprese.

#### 4.4 Metody *in vitro* části studie

V rámci předkládané diplomové práce byla v senzitivní (SKOV3/S) a paclitaxel rezistentní (SKOV3/PCT-RES) nádorové buněčné linii karcinomu ovaria za pomoci *in vitro* metodik sledována účinnost paclitaxelu v porovnání s SB-T taxany druhé a třetí generace (SB-T-1216, SB-T-121602 SB-T-121605, SB-T-121606). Základní struktura taxanů je znázorněna na **Obrázku č. 19**, porovnání konvenčních taxanů a nových taxanových SB-T derivátů pak popisuje **Tabulka č. 15**.



**Obrázek 19:** Základní struktura taxanů a pozice substituentů u taxanových derivátů Převzato a upraveno dle (Koucká, 2018).

**Tabulka 15:** Porovnání konvenčních taxanů v porovnání s taxanovými SB-T deriváty II. a III. generace experimentální řady 1216. Převzato a upraveno dle (Koucká, 2018).

| Taxany                      | Substituent         |                |                |                    |   |
|-----------------------------|---------------------|----------------|----------------|--------------------|---|
|                             | R <sup>1</sup>      | R <sup>2</sup> | R <sup>3</sup> | X                  | Y |
| <b>Konvenční taxany</b>     |                     |                |                |                    |   |
| <b>Paclitaxel</b>           | Ac                  | Ph             | PhCO           | H                  | H |
| <b>Taxany II. generace</b>  |                     |                |                |                    |   |
| <b>SB-T-1214</b>            | c-PrCO              | i-butenyl      | t-Boc          | H                  | H |
| <b>SB-T-1216</b>            | Me <sub>2</sub> NCO | i-butenyl      | t-Boc          | H                  | H |
| <b>Taxany III. generace</b> |                     |                |                |                    |   |
| <b>SB-T-121602</b>          | c-PrCO              | i-butenyl      | t-Boc          | Me                 | H |
| <b>SB-T-121605</b>          | Me <sub>2</sub> NCO | i-butenyl      | t-Boc          | OCF <sub>3</sub>   | H |
| <b>SB-T-121606</b>          | Me <sub>2</sub> NCO | i-butenyl      | t-Boc          | OCF <sub>2</sub> H | H |



#### 4.4.1 Práce s buněčnými kulturami

*In vitro* část této práce byla provedena na modelové buněčné linii karcinomu ovaria SKOV3, která byla pořízena z CLS (Cell lines service, Německo). Z této buněčné linie byla dlouhodobou kultivací na zvyšující se koncentraci paclitaxelu vyvinuta linie SKOV3/PCT-RES (SKOV3/R) se získanou rezistencí k paclitaxelu. Tato linie byla v době experimentu pasážována na konečné koncentraci paclitaxelu 500 nM. Tyto buněčné linie byly pěstovány na médiu McCoy's 5A (viz **Tabulka č. 16**) při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> a byly pravidelně pasážovány pomocí 0,25% trypsinu a 0,02% roztoku EDTA (PanBiotech).

**Tabulka 16:** Přesné složení McCoy's média

| <b>McCoy's 5A Medium:</b> L-Glutamine (1,5mM) , NaHCO <sub>3</sub> (2.2 g/l)  |                        |
|---|------------------------|
| L-Glutamine-Penicillin-Streptomycin (200 mM L-Glutamine, 10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin) v 0.9% NaCl | 5 ml na 500 ml média   |
| Pyruvát sodný (100mM)   | 5 ml na 500 ml média   |
| Hepes pufr (1M)   | 7,5 ml na 500 ml média |
| Sterilní FBS (0,2µm)  | 57,5 ml (10 %)         |

Při práci s buněčnými kulturami je nutné klást zvýšený důraz na zachování sterilního prostředí. Proto byla veškerá manipulace s těmito kulturami prováděna v laminárním boxu za použití sterilních nástrojů a sterilního spotřebního materiálu určeného přímo pro práci s buněčnými kulturami. Před samotným zahájením práce byly veškeré povrchy v již vysterilizovaném boxu ošetřeny 70% ethanolem. Pro zamezení kontaminace byly veškeré zásobní roztoky (zásobní médium, trypsin) otevírány až po důkladném opálení nad plynovým kahanem.

#### 4.4.2 Stanovení cytotoxicity taxanů pomocí fluorescenčního Cell Titer Blue kitu

Pro nasazení buněk byly narostlé adherentní buňky uvolněny pomocí trypsinu z povrchu kultivační nádoby a po resuspendování v přidavku čistého média byly přeneseny do sterilní zkumavky a centrifugovány (8 min, 223 × g, při laboratorní teplotě). Po centrifugaci bylo médium odlito a byl přidán konkrétní objem média v závislosti na množství buněk. Po přidavku média byla peleta resuspendována a bylo odebráno 50 µl buněčné suspenze do Bürkerovy komůrky. Po spočtení buněk v komůrce byla zbylá buněčná suspenze na základě výpočtu naředěna na příslušnou koncentraci 50 000 buněk/ml média.

Nařaděná buněčná suspenze byla nasazena na 96jamkovou destičku v koncentraci 5 000 buněk/100 µl/jamka. Po 18 hodinách bylo odebráno původní médium a k buňkám bylo přidáno médium s vzestupnou koncentrací sledovaného taxanu. Každá koncentrace cytostatika byla k buňkám pipetována v triplikátech pro větší přesnost pokusu. Použité koncentrace příslušných taxanů pro senzitivní a rezistentní buněčné linie jsou vypsány v **Tabulce č. 17 a 18**.

**Tabulka 17:** Použité koncentrace jednotlivých taxanů pro senzitivní buněčnou linii SKOV3/S

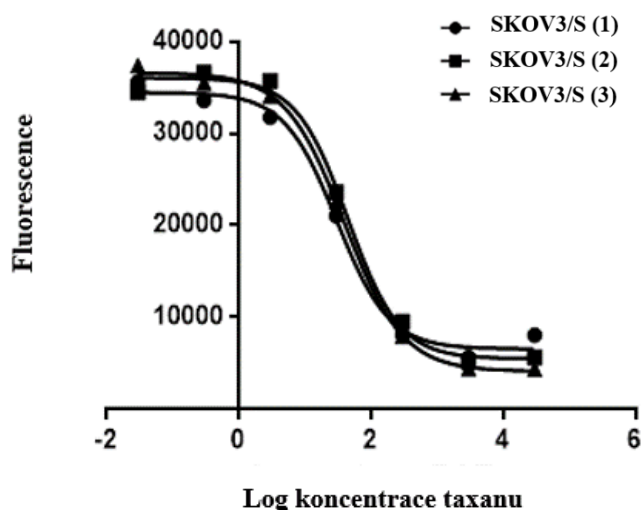
|                                | PCT   | SB-T-1216 | SB-T-121602 | SB-T-121605 | SB-T-121606 |
|--------------------------------|-------|-----------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Koncentrace taxanu [nM]</b> |       |           | 0,003       | 0,003       | 0,003       |
|                                | 0,03  | 0,03      | 0,03        | 0,03        | 0,03        |
|                                | 0,3   | 0,3       | 0,3         | 0,3         | 0,3         |
|                                | 3     | 3         | 3           | 3           | 3           |
|                                | 30    | 30        | 30          | 30          | 30          |
|                                | 300   | 300       | 300         | 300         | 300         |
|                                | 3000  | 3000      | 3000        | 3000        | 3000        |
|                                | 30000 | 30000     | 30000       | 30000       | 30000       |
|                                |       |           | 50000       | 50000       | 50000       |

**Tabulka 18:** Použité koncentrace jednotlivých taxanů pro rezistentní buněčnou linii SKOV3/R

|                                | PCT  | SB-T-1216 | SB-T-121602 | SB-T-121605 | SB-T-121606 |
|--------------------------------|------|-----------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Koncentrace taxanu [nM]</b> |      |           | 0,003       | 0,003       | 0,003       |
|                                | 0,03 | 0,03      | 0,03        | 0,03        | 0,03        |
|                                | 0,3  | 0,3       | 0,3         | 0,3         | 0,3         |
|                                | 3    | 3         | 3           | 3           | 3           |
|                                | 10   | 30        | 30          | 30          | 30          |
|                                | 30   | 300       | 300         | 300         | 300         |
|                                | 100  | 3000      | 3000        | 3000        | 3000        |
|                                | 300  | 30000     | 30000       | 30000       | 30000       |
|                                | 1000 | -         | 50000       | 50000       | -           |

Po 72 hodinách od inkubace s taxany byla pomocí kitu CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega) stanovena intenzita fluorescence u obou linií a u všech příslušných koncentrací jednotlivých taxanů. Kit CellTiter-Blue® se využívá pro určení počtu živých buněk na základě detekce fluorescenčního signálu. Principem této metody je schopnost živých buněk metabolizovat redoxní barvivo resazurin na fluorescenční produkt resorufin. Mrtvé buňky velmi rychle ztrácí schopnost tyto látky metabolizovat, a proto neposkytují žádný fluorescenční signál. Po dvou hodinách od přidání kitu byla destička promíchána a byla změřena fluorescence na spektrofotometru Infinite M200 (Tecan).

Intenzita fluorescence byla vyhodnocena při vlnové délce excitace 560 nm a vlnové délce emise 590 nm. Tímto způsobem byly provedeny tři na sobě nezávislé experimenty a z naměřených hodnot fluorescence byla pomocí programu GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software) stanovena hodnota  $IC_{50}$  a byl sestaven graf nelineární Počet pacientek regrese. Graf pro vyhodnocení  $IC_{50}$  je znázorněn na **Obrázku č. 20**.



**Obrázek 20:** Vyhodnocení  $IC_{50}$  pomocí programu GraphPad 6.0 pro senzitivní buněčnou linii SKOV3/S inkubovanou paclitaxelem. Stanovení  $IC_{50}$  pro příslušnou linii bylo provedeno ve třech na sobě nezávislých experimentech SKOV3/S (1), SKOV3/S (2), SKOV3/S (3).

#### 4.4.3 Stanovení genové exprese *ABCC3*, *TRIP6* a *CPS1* v buněčných kulturách

Pro stanovení genové exprese v buněčných liniích byly obě linie nasazeny na Petriho misky (60 x 15 mm) v koncentraci 500 000 buněk/Petriho miska a ponechány adherovat do druhého dne. Na základě stanovených hodnot  $IC_{50}$  byly obě buněčné linie následně inkubovány v médiu s adekvátní koncentrací příslušného taxanu. Po 48 hodinách byly buňky pomocí trypsinu sklizeny do původního média a byly centrifugovány (5 min,  $303 \times g$ ,  $4^\circ C$ ). Získaná peleta byla resuspendována ve 2 ml studeného PBS a suspenze buněk byla přenesena do mikrozkuřavky, která byla opět centrifugována (5 min,  $316 \times g$ ,  $4^\circ C$ ). Peleta byla následně ještě jednou promyta 1 ml PBS a stočena (5 min,  $316 \times g$ ,  $4^\circ C$ ). Po centrifugaci byla peleta resuspendována v 600  $\mu l$  RLT pufru s  $\beta$ -merkaptethanolem a po řádném promíchání na vortexu byl vzorek uchován v  $-80^\circ C$  pro pozdější izolaci RNA. Izolace DNA, RNA a proteinu z buněčných linií byla provedena pomocí kitu AllPrep<sup>®</sup> DNA/RNA/Protein Mini Kit (QIAGEN) stejným způsobem jako u nádorových tkání (viz kapitola 4.3.1.1).

Před samotným stanovením genové exprese v buněčných kulturách bylo provedeno měření koncentrace RNA, syntéza cDNA a ověření její kvality stejně jako ve vzorcích nádorové tkáně. Měření genové exprese na vzorcích cDNA bylo opět provedeno kvantitativní PCR reakcí. U všech vzorků byla nejprve stanovena exprese housekeepingových genů, které byly při statistickém zpracování využity jako referenční geny pro normalizaci exprese kandidátních genů. Studované geny byly opět *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6*, jednotlivé TaqMan assays použité pro stanovení jsou vypsány v rámci kapitoly 4.3.4 (Tabulka č. 10)

#### 4.4.4 Statistické vyhodnocení genové exprese v tkáňových kulturách

Pro statistické vyhodnocení změn genové exprese v nádorových buňkách působením taxanů byly naměřené hodnoty expresí ve vzorcích normalizovány pomocí  $\Delta Ct$ , jak je popsáno v kapitole 4.3.6. a dále byly zpracovány metodou  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  podle následujícího vzorce:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{buňky s aplikací taxanů}) - \Delta Ct (\text{buňky bez aplikace})$$

$$2^{-(\Delta\Delta Ct)} = \text{změny genové exprese (fold change)}$$

V rámci tohoto vyhodnocení byla nejprve porovnána genová exprese v buňkách inkubovaných s konkrétním taxanem vždy zvlášť pro senzitivní buněčnou linii (kontrola vs. vzorek) a pro rezistentní buněčnou linii (kontrola vs. vzorek). Takto získaná data byly pro obě linie vyhodnoceny pomocí parametrického t-testu s cílem nalezení signifikantních vztahů mezi změnou exprese v kontrolních vzorcích a jednotlivých vzorcích po aplikaci příslušného taxanu. Na základě této analýzy bylo vyhodnoceno ovlivnění genové exprese působením vybraných taxanových derivátů v senzitivních a rezistentních buněčných liniích ovariálního karcinomu.

## 5 Výsledky

V rámci překládané diplomové práce byla v první části provedena studie genové exprese nedávno odhalených genetických markerů (*ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6*) s cílem potvrzení potenciálního prognostického významu těchto kandidátních genů. Hladiny exprese zmíněných genů byly stanoveny ve vzorcích nádorové tkáně karcinomu ovaria a prsu s následným vyhodnocením asociací s klinicko-patologickými daty pacientek, prognózou a léčebnou odpovědí sledovaných kohort pacientek. Jako součást studie s klinickými vzorky bylo na příkladu miRNA cílící na zmiňované geny, provedeno zavedení metodiky stanovení exprese miRNA jako významných regulátorů genové exprese.

V druhé *in vitro* části diplomové práce byla porovnána účinnost nových taxanových derivátů II. (SB-T-1216) a III. generace (SB-T-121602, SB-T-121605, SB-T-121606) s paclitaxelem v senzitivních a rezistentních buněčných liniích ovariálního karcinomu. Po stanovení  $IC_{50}$  u obou buněčných linií pro zvolené taxany byla stanovena a vyhodnocena genové exprese již zmíněných genetických markerů v senzitivních a rezistentních buňkách karcinomu ovaria. U genu *CPS1* s největším významem u karcinomu ovaria byly měřeny jeho exprese před a po aplikaci paclitaxelu a SB-T taxanových derivátů. Získané hodnoty expresí byly následně porovnány mezi jednotlivými taxany, senzitivními a rezistentními buňkami a byly sledovány případné deregulace genové exprese *CPS1* vyvolané aplikací taxanů.

### 5.1 Studie s klinickými vzorky

#### 5.1.1 Studium exprese kandidátních genů *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* u pacientek s karcinomem ovaria a prsu

Pro stanovení míry genové exprese kandidátních genů *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* byla nejprve provedena izolace RNA ze vzorků nádorové tkáně, která byla následně pomocí reverzní transkripce přepsána na cDNA. Samotná analýza genové exprese byla provedena pomocí real-time PCR na analyzátoru ViiA7. Naměřené průměrné hodnoty expresí Ct kandidátních a kontrolních genů (*MRPL19*, *EIF2B1*, *IPO8* pro karcinom prsu; *PPIA*, *UBC*, *YWHAZ* pro karcinom ovaria) u jednotlivých vzorků jsou uvedeny v **Tabulce č. 19 a 20**.

**Tabulka 19:** Průměrné hodnoty exprese kontrolních a kandidátních genů pro vzorky karcinomu ovaria

|               | <b>Průměr Ct hodnot</b> |                    |                     |                     |                     |                    |
|---------------|-------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| <b>Vzorek</b> | <b><i>UBC</i></b>       | <b><i>PPIA</i></b> | <b><i>YWHAZ</i></b> | <b><i>TRIP6</i></b> | <b><i>ABCC3</i></b> | <b><i>CPS1</i></b> |
| <b>PL11T</b>  | 22,05                   | 20,65              | 19,59               | 23,91               | 28,35               | 28,55              |
| <b>PL20T</b>  | 21,45                   | 20,54              | 20,25               | 24,24               | 28,51               | 31,25              |
| <b>PL24T</b>  | 21,73                   | 20,25              | 19,80               | 24,66               | 28,86               | 31,55              |
| <b>PL25T</b>  | 20,91                   | 19,32              | 18,25               | 24,25               | 29,10               | 32,18              |
| <b>PL29T</b>  | 22,22                   | 21,31              | 20,68               | 25,24               | 28,17               | 33,92              |
| <b>PL30T</b>  | 21,68                   | 20,73              | 20,92               | 24,46               | 29,80               | 30,05              |
| <b>PL31T</b>  | 22,30                   | 20,96              | 20,13               | 25,55               | 23,98               | 29,00              |
| <b>PL32T</b>  | 26,68                   | 25,60              | 25,44               | 29,87               | 30,07               | 34,86              |
| <b>PL34T</b>  | 23,27                   | 22,47              | 21,92               | 25,92               | 26,08               | 29,73              |
| <b>PL37T</b>  | 21,04                   | 20,47              | 18,85               | 23,53               | 27,79               | 32,09              |
| <b>PL3T</b>   | 21,49                   | 20,36              | 20,23               | 23,80               | 27,86               | 26,61              |
| <b>PL41T</b>  | 22,50                   | 19,90              | 19,68               | 22,67               | 30,29               | 31,47              |
| <b>PL69T</b>  | 24,26                   | 23,82              | 23,61               | 26,51               | 30,96               | 30,43              |
| <b>PL70T</b>  | 21,82                   | 21,35              | 20,54               | 22,99               | 28,72               | 31,01              |
| <b>PL72T</b>  | 21,75                   | 23,06              | 20,37               | 23,48               | 27,68               | 29,31              |
| <b>PL74T</b>  | 21,95                   | 21,82              | 20,66               | 25,05               | 31,40               | 29,86              |
| <b>PL83T</b>  | 23,47                   | 21,81              | 22,92               | 23,76               | 25,27               | 32,84              |
| <b>PL84T</b>  | 21,42                   | 21,13              | 20,78               | 24,65               | 27,13               | 28,53              |
| <b>PL88T</b>  | 21,50                   | 20,27              | 19,58               | 23,74               | 28,04               | 30,23              |
| <b>R101T</b>  | 21,96                   | 21,01              | 20,98               | 25,09               | 25,47               | 28,37              |
| <b>R102T</b>  | 21,46                   | 20,70              | 19,68               | 23,85               | 27,61               | 30,13              |
| <b>R103T</b>  | 21,91                   | 20,98              | 21,04               | 25,09               | 27,02               | 28,35              |
| <b>R105T</b>  | 22,76                   | 20,32              | 20,30               | 24,14               | 28,38               | 29,75              |
| <b>R107T</b>  | 21,48                   | 20,14              | 20,01               | 25,33               | 32,82               | 28,06              |
| <b>R109T</b>  | 20,81                   | 20,30              | 19,79               | 23,38               | 30,00               | 33,03              |
| <b>R110T</b>  | 21,43                   | 22,14              | 21,04               | 22,92               | 28,82               | 31,16              |
| <b>R111T</b>  | 22,76                   | 22,20              | 21,51               | 25,58               | 29,30               | 31,33              |
| <b>R112T</b>  | 22,08                   | 20,95              | 19,32               | 24,09               | 27,14               | 29,11              |
| <b>R115T</b>  | 22,63                   | 21,12              | 20,19               | 27,44               | 27,15               | 32,01              |
| <b>R116T</b>  | 24,30                   | 22,55              | 21,67               | 27,01               | 30,55               | 31,52              |
| <b>R117T</b>  | 22,09                   | 21,48              | 20,88               | 23,19               | 28,03               | 27,62              |
| <b>R118T</b>  | 21,92                   | 20,98              | 19,77               | 24,79               | 26,73               | 30,43              |
| <b>R119T</b>  | 22,72                   | 21,27              | 21,59               | 25,23               | 28,86               | 33,59              |
| <b>R11T</b>   | 23,70                   | 21,46              | 21,87               | 23,42               | 28,15               | 28,88              |
| <b>R121T</b>  | 21,96                   | 20,92              | 19,53               | 23,48               | 28,43               | 30,86              |
| <b>R122T</b>  | 23,00                   | 21,76              | 20,88               | 26,22               | 29,37               | 31,79              |
| <b>R123T</b>  | 21,65                   | 20,63              | 19,40               | 24,26               | 27,81               | 28,15              |
| <b>R125T</b>  | 21,69                   | 20,75              | 20,46               | 23,92               | 25,81               | 29,04              |
| <b>R127T</b>  | 21,66                   | 20,59              | 20,51               | 24,91               | 29,36               | 29,73              |

|        | Průměr Ct hodnot |             |              |              |              |             |
|--------|------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| Vzorek | <i>UBC</i>       | <i>PPIA</i> | <i>YWHAZ</i> | <i>TRIP6</i> | <i>ABCC3</i> | <i>CPS1</i> |
| R128T  | 22,62            | 21,28       | 20,28        | 24,03        | 29,04        | 30,92       |
| R12T   | 23,09            | 21,99       | 21,52        | 26,63        | 30,27        | 32,08       |
| R131T  | 21,20            | 20,98       | 19,68        | 25,81        | 26,61        | 32,43       |
| R133T  | 22,02            | 21,26       | 20,84        | 26,58        | 28,79        | 31,46       |
| R136T  | 21,19            | 20,33       | 19,71        | 24,69        | 27,77        | 29,87       |
| R137T  | 25,22            | 21,89       | 21,64        | 24,88        | 30,61        | 27,57       |
| R138T  | 21,44            | 20,63       | 18,74        | 24,84        | 27,57        | 29,17       |
| R139T  | 23,54            | 22,17       | 22,05        | 26,59        | 30,30        | 31,04       |
| R141T  | 21,52            | 21,16       | 20,27        | 24,70        | 29,07        | 30,11       |
| R143T  | 21,94            | 20,43       | 20,18        | 25,35        | 28,46        | 31,01       |
| R144T  | 22,33            | 21,54       | 21,05        | 25,58        | 29,07        | 29,67       |
| R145T  | 25,23            | 22,93       | 22,47        | 24,95        | 30,92        | 25,85       |
| R146T  | 22,04            | 21,47       | 19,74        | 24,35        | 27,40        | 30,63       |
| R148T  | 24,39            | 23,64       | 24,81        | 27,08        | 29,76        | 31,45       |
| R149T  | 21,20            | 20,55       | 19,47        | 24,08        | 27,24        | 32,54       |
| R150T  | 21,08            | 20,70       | 19,57        | 23,86        | 26,78        | 29,45       |
| R151T  | 21,93            | 21,52       | 19,64        | 24,13        | 27,04        | 28,71       |
| R152T  | 23,72            | 23,27       | 22,68        | 27,23        | 31,88        | 32,21       |
| R155T  | 21,84            | 20,73       | 19,89        | 24,95        | 28,05        | 29,11       |
| R156T  | 22,61            | 21,86       | 20,50        | 24,23        | 27,07        | 30,52       |
| R157T  | 22,82            | 21,74       | 20,99        | 25,38        | 28,33        | 31,40       |
| R158T  | 23,19            | 22,13       | 20,74        | 24,46        | 25,51        | 27,41       |
| R159T  | 22,89            | 21,52       | 20,79        | 26,03        | 30,13        | 33,54       |
| R15T   | 24,06            | 22,05       | 23,06        | 25,97        | 24,48        | 27,39       |
| R160T  | 22,02            | 21,37       | 19,39        | 25,84        | 27,57        | 29,89       |
| R162T  | 21,71            | 22,52       | 20,17        | 25,81        | 27,04        | 29,36       |
| R163T  | 22,81            | 21,94       | 21,42        | 25,28        | 29,12        | 30,92       |
| R164T  | 21,96            | 21,01       | 18,74        | 23,08        | 28,38        | 31,65       |
| R165T  | 25,90            | 25,65       | 24,78        | 29,21        | 32,59        | 33,47       |
| R167T  | 22,52            | 21,86       | 21,50        | 26,35        | 29,61        | 31,86       |
| R168T  | 22,34            | 21,67       | 20,45        | 25,72        | 28,41        | 29,92       |
| R16T   | 21,95            | 20,22       | 20,03        | 24,45        | 26,82        | 30,34       |
| R17T   | 22,05            | 20,73       | 20,19        | 24,72        | 24,10        | 28,92       |
| R20T   | 22,81            | 21,64       | 21,70        | 24,22        | 26,96        | 30,16       |
| R21T   | 22,89            | 21,27       | 20,96        | 30,15        | 29,58        | 32,82       |
| R22T   | 22,94            | 22,47       | 21,88        | 24,08        | 27,24        | 28,20       |
| R23T   | 21,53            | 20,41       | 19,95        | 24,55        | 27,28        | 31,46       |
| R24T   | 21,99            | 20,83       | 19,65        | 23,33        | 28,80        | 33,11       |
| R27T   | 21,75            | 20,43       | 20,10        | 24,67        | 28,31        | 28,99       |
| R32T   | 22,69            | 21,64       | 21,11        | 24,45        | 27,07        | 29,84       |

|        | Průměr Ct  |             |              |              |              |             |
|--------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| Vzorek | <i>UBC</i> | <i>PPIA</i> | <i>YWHAZ</i> | <i>TRIP6</i> | <i>ABCC3</i> | <i>CPS1</i> |
| R33T   | 23,12      | 22,50       | 22,64        | 25,09        | 28,03        | 30,60       |
| R34T   | 20,88      | 20,88       | 19,43        | 22,62        | 31,48        | 28,95       |
| R35T   | 22,65      | 21,42       | 19,51        | 25,91        | 30,21        | 23,49       |
| R38T   | 21,66      | 20,88       | 19,73        | 26,45        | 29,96        | 31,65       |
| R41T   | 21,30      | 21,70       | 19,15        | 23,95        | 27,07        | 27,12       |
| R42T   | 21,30      | 21,56       | 19,69        | 23,14        | 27,75        | 23,59       |
| R43T   | 21,04      | 19,85       | 18,98        | 25,07        | 27,82        | 30,46       |
| R44T   | 21,59      | 20,89       | 20,72        | 22,92        | 26,26        | 28,86       |
| R45T   | 22,72      | 21,88       | 21,57        | 23,65        | 29,00        | 32,01       |
| R47T   | 21,33      | 19,90       | 20,09        | 24,08        | 25,91        | 29,68       |
| R4T    | 23,77      | 22,60       | 22,62        | 25,83        | 27,03        | 30,78       |
| R50T   | 20,94      | 20,64       | 21,51        | 23,29        | 26,10        | 30,08       |
| R53T   | 20,77      | 19,61       | 18,98        | 23,64        | 27,63        | 30,69       |
| R54T   | 23,17      | 21,45       | 21,63        | 24,68        | 27,25        | 29,19       |
| R55T   | 21,99      | 20,85       | 19,06        | 25,28        | 29,38        | 31,28       |
| R56T   | 21,85      | 20,71       | 21,93        | 22,59        | 26,01        | 29,22       |
| R58T   | 22,72      | 21,53       | 23,39        | 25,31        | 27,92        | 28,78       |
| R59T   | 21,49      | 19,64       | 20,53        | 21,84        | 26,09        | 27,45       |
| R62T   | 21,40      | 20,39       | 19,76        | 24,11        | 27,38        | 27,64       |
| R66T   | 23,64      | 22,54       | 22,72        | 26,26        | 27,27        | 28,17       |
| R6T    | 24,72      | 23,23       | 25,36        | 25,26        | 27,36        | 30,73       |
| R70T   | 22,14      | 21,27       | 20,05        | 25,98        | 27,93        | 31,23       |
| R71T   | 23,11      | 22,19       | 21,85        | 24,15        | 29,46        | 28,02       |
| R76T   | 23,93      | 22,94       | 22,33        | 23,63        | 26,58        | 29,56       |
| R77T   | 21,74      | 20,37       | 20,33        | 25,63        | 24,30        | 30,00       |
| R79T   | 24,63      | 22,66       | 22,76        | 24,86        | 28,00        | 32,37       |
| R7T    | 23,13      | 21,39       | 21,60        | 25,69        | 27,24        | 29,91       |
| R88T   | 25,02      | 22,41       | 24,57        | 26,01        | 27,00        | 28,85       |
| R90T   | 21,54      | 21,29       | 20,97        | 23,55        | 28,48        | 30,22       |
| R92T   | 22,39      | 20,64       | 20,13        | 23,91        | 26,11        | 30,16       |
| R93T   | 21,19      | 20,98       | 19,41        | 22,80        | 26,49        | 27,09       |
| R95T   | 22,66      | 22,06       | 21,92        | 25,48        | 27,83        | 31,24       |
| R96T   | 22,85      | 21,86       | 20,35        | 26,04        | 30,37        | 32,09       |
| R97T   | 22,06      | 20,47       | 21,89        | 24,66        | 27,30        | 32,23       |
| R98T   | 22,39      | 21,29       | 20,63        | 26,39        | 28,72        | 31,26       |
| R99T   | 22,12      | 21,40       | 21,77        | 25,10        | 28,40        | 28,94       |



**Tabulka 20:** Průměrné hodnoty exprese kontrolních a kandidátních genů pro vzorky karcinomu prsu

|        | Průměr Ct     |               |             |              |              |             |
|--------|---------------|---------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| Vzorek | <i>MRPL19</i> | <i>EIF2B1</i> | <i>IPO8</i> | <i>TRIP6</i> | <i>ABCC3</i> | <i>CPS1</i> |
| P206   | 27,15         | 27,06         | 28,03       | 27,15        | 23,68        | 30,95       |
| P270   | 27,52         | 27,09         | 27,36       | 28,74        | 30,17        | 30,43       |
| P279   | 28,57         | 28,39         | 28,41       | 29,59        | 30,01        | 31,18       |
| P298   | 26,86         | 26,04         | 26,32       | 27,02        | 28,19        | 29,47       |
| P521   | 24,91         | 25,50         | 26,10       | 24,55        | 30,60        | 30,78       |
| P324   | 26,82         | 27,00         | 27,07       | 28,84        | 30,44        | 23,11       |
| P338   | 26,15         | 25,89         | 26,58       | 27,53        | 29,24        | 32,14       |
| P341   | 26,24         | 26,31         | 26,55       | 28,09        | 29,51        | 32,59       |
| P542   | 26,49         | 26,38         | 26,58       | 26,70        | 25,51        | 31,79       |
| M115T  | 25,16         | 24,87         | 25,67       | 27,06        | 24,59        | 31,29       |
| M152T  | 25,80         | 24,98         | 25,97       | 24,48        | 28,60        | 30,05       |
| M169T  | 25,94         | 24,70         | 25,85       | 24,45        | 25,43        | 29,08       |
| M199T  | 26,81         | 25,56         | 27,99       | 27,62        | 27,83        | 30,30       |
| M202T  | 26,48         | 25,58         | 26,79       | 28,09        | 27,38        | 31,17       |
| M245T  | 26,29         | 25,77         | 26,13       | 25,99        | 27,90        | 28,07       |
| M253T  | 24,48         | 24,52         | 25,27       | 25,10        | 25,32        | 30,58       |
| M258T  | 25,18         | 24,08         | 24,87       | 23,89        | 25,94        | 26,98       |
| M261T  | 25,44         | 25,04         | 25,48       | 26,19        | 27,53        | 28,40       |
| M289T  | 25,77         | 25,14         | 25,51       | 25,89        | 27,19        | 32,00       |
| M297T  | 27,14         | 26,21         | 27,08       | 26,13        | 27,87        | 30,80       |
| M299T  | 24,99         | 25,03         | 25,66       | 27,19        | 27,56        | 29,95       |
| M408T  | 26,31         | 25,61         | 26,40       | 26,48        | 28,32        | 29,74       |
| M420T  | 25,53         | 24,83         | 25,44       | 25,37        | 28,86        | 30,02       |
| M069T  | 25,47         | 25,34         | 26,45       | 25,30        | 28,94        | 30,86       |
| P021T  | 26,04         | 24,47         | 26,92       | 26,29        | 27,61        | 30,91       |
| P026T  | 25,96         | 25,31         | 26,55       | 26,68        | 28,60        | 29,66       |
| P044T  | 27,58         | 26,95         | 29,01       | 27,98        | 29,75        | 29,46       |
| P049T  | 26,19         | 25,57         | 26,82       | 26,67        | 28,88        | 32,81       |
| P061T  | 28,37         | 26,22         | 28,07       | 27,55        | 27,59        | 31,85       |
| P115T  | 25,77         | 24,88         | 26,32       | 25,45        | 23,83        | 30,96       |
| P125T  | 26,60         | 26,13         | 27,81       | 25,79        | 27,01        | 32,81       |
| P151T  | 26,63         | 25,58         | 26,63       | 25,82        | 27,56        | 27,18       |
| P158T  | 26,83         | 26,29         | 28,74       | 26,12        | 29,03        | 31,76       |
| P174T  | 26,36         | 25,01         | 26,49       | 27,20        | 27,14        | 29,90       |
| P176T  | 26,20         | 25,96         | 26,83       | 27,26        | 28,30        | 31,38       |
| P179T  | 25,95         | 24,97         | 26,19       | 26,87        | 26,48        | 29,50       |
| P188T  | 26,51         | 25,55         | 26,58       | 25,79        | 25,91        | 28,24       |
| P189T  | 26,48         | 25,74         | 27,08       | 27,61        | 29,63        | 32,43       |

|        | Průměr Ct     |               |             |              |              |             |
|--------|---------------|---------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| Vzorek | <i>MRPL19</i> | <i>EIF2B1</i> | <i>IPO8</i> | <i>TRIP6</i> | <i>ABCC3</i> | <i>CPS1</i> |
| P190T  | 26,80         | 25,61         | 26,93       | 25,99        | 27,71        | 31,15       |
| P196T  | 26,70         | 25,32         | 26,98       | 27,65        | 28,97        | 29,85       |
| P207T  | 28,77         | 27,50         | 29,87       | 30,86        | 34,24        | 35,10       |
| P210T  | 30,91         | 29,37         | 32,74       | 30,76        | 31,40        | 35,33       |
| P215T  | 26,87         | 25,97         | 27,71       | 26,79        | 29,00        | 31,56       |
| P217T  | 26,12         | 25,33         | 26,61       | 26,98        | 24,54        | 31,12       |
| P220T  | 26,10         | 25,50         | 27,35       | 26,57        | 29,13        | 32,09       |
| P227T  | 29,54         | 28,41         | 29,53       | 29,53        | 29,71        | 31,62       |
| P272T  | 26,41         | 25,82         | 27,04       | 25,96        | 27,32        | 30,69       |
| P287T  | 27,71         | 26,23         | 27,69       | 27,92        | 28,34        | 29,87       |
| P290T  | 26,63         | 25,55         | 27,10       | 26,94        | 28,78        | 32,13       |
| P332T  | 25,54         | 25,34         | 26,16       | 25,11        | 27,91        | 31,18       |
| P368T  | 26,54         | 25,78         | 27,07       | 26,92        | 28,76        | 30,03       |
| P377T  | 26,14         | 25,28         | 26,77       | 28,25        | 27,25        | 31,17       |
| P400T  | 25,69         | 25,31         | 26,48       | 26,67        | 27,93        | 30,11       |
| P408T  | 26,86         | 26,69         | 27,59       | 26,50        | 27,69        | 30,48       |
| P420T  | 28,07         | 27,37         | 28,50       | 28,50        | 30,41        | 32,95       |
| P421T  | 26,76         | 26,05         | 27,43       | 25,82        | 26,51        | 32,31       |
| P422T  | 26,55         | 25,99         | 27,05       | 27,99        | 29,53        | 31,50       |
| P424T  | 26,27         | 25,21         | 26,30       | 25,37        | 27,87        | 30,16       |
| P477T  | 27,36         | 26,50         | 28,01       | 26,98        | 29,42        | 30,82       |
| P489T  | 26,04         | 25,01         | 26,63       | 24,92        | 26,07        | 30,32       |
| P494T  | 26,72         | 25,70         | 26,85       | 25,72        | 30,05        | 30,29       |
| P525T  | 26,25         | 25,41         | 26,68       | 26,50        | 27,17        | 30,48       |
| P534T  | 25,65         | 25,02         | 26,65       | 27,60        | 27,75        | 30,58       |
| P535T  | 27,00         | 25,92         | 27,32       | 27,95        | 28,52        | 29,76       |
| P539T  | 28,19         | 26,92         | 27,84       | 27,81        | 28,66        | 30,78       |
| P596T  | 26,19         | 26,00         | 26,54       | 25,94        | 28,15        | 29,61       |
| P611T  | 26,69         | 26,11         | 27,02       | 26,70        | 28,55        | 30,29       |
| Z022T  | 27,10         | 26,40         | 28,71       | 28,56        | 27,61        | 31,06       |
| Z039T  | 26,54         | 25,95         | 26,88       | 27,01        | 29,39        | 30,59       |
| Z078T  | 26,51         | 25,74         | 26,61       | 28,27        | 25,79        | 31,34       |
| Z138T  | 27,61         | 27,21         | 27,21       | 28,44        | 28,55        | 31,91       |
| Z139T  | 26,38         | 25,62         | 26,62       | 27,72        | 27,76        | 28,26       |
| Z145T  | 26,32         | 26,80         | 27,81       | 27,18        | 29,83        | 30,62       |
| Z148T  | 26,43         | 25,76         | 27,03       | 28,13        | 30,12        | 31,55       |
| Z157T  | 26,29         | 25,78         | 27,03       | 28,09        | 29,29        | 30,60       |
| Z159T  | 27,77         | 26,60         | 27,75       | 29,05        | 29,70        | 31,46       |
| Z160T  | 26,89         | 25,93         | 27,45       | 26,60        | 26,93        | 29,97       |

|              | Průměr Ct     |               |             |              |              |             |
|--------------|---------------|---------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| Vzorek       | <i>MRPL19</i> | <i>EIF2B1</i> | <i>IPO8</i> | <i>TRIP6</i> | <i>ABCC3</i> | <i>CPS1</i> |
| <b>Z161T</b> | 26,26         | 25,84         | 27,05       | 25,43        | 29,61        | 31,31       |
| <b>Z163T</b> | 26,70         | 26,04         | 27,29       | 27,00        | 27,91        | 29,90       |
| <b>Z168T</b> | 27,01         | 26,56         | 27,34       | 28,22        | 29,33        | 32,65       |
| <b>Z182T</b> | 26,93         | 26,13         | 27,81       | 29,68        | 30,12        | 31,52       |
| <b>Z183T</b> | 26,80         | 26,04         | 27,33       | 29,50        | 30,72        | 31,50       |
| <b>Z187T</b> | 26,52         | 26,75         | 26,91       | 27,73        | 28,94        | 31,01       |
| <b>Z188T</b> | 26,72         | 26,03         | 27,40       | 27,45        | 29,88        | 31,63       |
| <b>Z194T</b> | 27,42         | 26,93         | 27,66       | 27,36        | 27,75        | 31,28       |
| <b>Z206T</b> | 25,75         | 25,78         | 26,62       | 25,12        | 26,84        | 31,90       |
| <b>Z223T</b> | 26,66         | 26,13         | 26,92       | 26,52        | 28,71        | 29,72       |
| <b>Z229T</b> | 27,66         | 26,95         | 27,45       | 29,05        | 29,33        | 31,73       |
| <b>Z256T</b> | 25,96         | 25,68         | 29,69       | 26,98        | 30,06        | 32,32       |
| <b>Z265T</b> | 26,82         | 26,35         | 27,51       | 27,58        | 29,21        | 31,29       |
| <b>Z267T</b> | 26,68         | 26,02         | 27,03       | 27,56        | 27,81        | 32,26       |
| <b>Z297T</b> | 27,34         | 26,06         | 27,24       | 28,80        | 28,49        | 31,94       |
| <b>Z303T</b> | 25,43         | 25,01         | 26,14       | 25,26        | 29,14        | 31,55       |
| <b>Z309T</b> | 26,76         | 25,87         | 26,66       | 27,70        | 27,60        | 30,65       |
| <b>Z315T</b> | 28,50         | 28,04         | 29,68       | 28,67        | 33,36        | 33,78       |
| <b>Z42T</b>  | 25,93         | 25,39         | 25,83       | 27,24        | 27,93        | 29,59       |
| <b>Z7T</b>   | 26,82         | 25,81         | 27,25       | 27,92        | 28,68        | 30,89       |

Před samotnou analýzou pomocí programu SPSS v16.0 byly hodnoty exprese normalizovány vůči expresi kontrolních genů. Podrobný postup normalizace a následného hodnocení exprese je popsán v kapitole 4.3.6.

Všechny sledované kandidátní geny (*ABCC3*, *CPS1*, *TRIP6*) byly ve vzorcích nádorové tkáně ovaria i prsu exprimovány. Ve vzorcích nádorové tkáně karcinomu ovaria byl nejvíce exprimován gen *TRIP6* následovaný genem *ABCC3* a *CPS1*. Oproti tomu ve vzorcích karcinomu prsu byl nejvíce exprimován gen *CPS1* následovaný genem *ABCC3* a *TRIP6*. Vzájemná korelace exprese genů *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* v obou kohortách pacientek byla stanovena pomocí Spearmanova testu v programu SPSS v16.0. Jednotlivé korelační vztahy jsou znázorněny v **Tabulce č. 21**, ze které je patrné, že exprese genů ve vzorcích ovariálního karcinomu vzájemně velmi významně korelovala s hodnotou významnosti (p-hodnotou) menší než 0,001. V případě karcinomu prsu, exprese *ABCC3* významně koreluje s expresí *TRIP6* a *CPS1*. Konkrétně je míra exprese *ABCC3* nepřímě úměrná expresi *CPS1* a *TRIP6*, tzn. s klesající expresí *ABCC3* narůstá exprese *CPS1* a *TRIP6*.

**Tabulka 21:** Korelační koeficienty a hladiny významnosti vzájemného porovnání exprese kandidátních genů ve vzorcích (A) ovariálního karcinomu (n = 113) a (B) prsního karcinomu (n = 88)

(A)

|              | <i>ABCC3</i> | <i>CPS1</i> | <i>TRIP6</i> |
|--------------|--------------|-------------|--------------|
| <i>ABCC3</i> |              |             |              |
| ρ            | -            | 0,434       | 0,351        |
| p            |              | <0,001      | <0,001       |
| <i>CPS1</i>  |              |             |              |
| ρ            | 0,434        | -           | 0,396        |
| p            | <0,001       |             | <0,001       |
| <i>TRIP6</i> |              |             |              |
| ρ            | 0,351        | 0,396       | -            |
| p            | <0,001       | <0,001      |              |

(B)

|              | <i>ABCC3</i> | <i>CPS1</i> | <i>TRIP6</i> |
|--------------|--------------|-------------|--------------|
| <i>ABCC3</i> |              |             |              |
| ρ            | -            | 0,226       | 0,218        |
| p            |              | 0,034       | 0,042        |
| <i>CPS1</i>  |              |             |              |
| ρ            | 0,226        | -           | 0,174        |
| p            | 0,034        |             | 0,104        |
| <i>TRIP6</i> |              |             |              |
| ρ            | 0,218        | 0,174       | -            |
| p            | 0,042        | 0,104       |              |

ρ = korelační koeficient  
p = hladina významnosti

### 5.1.2 Vztahy mezi expresí kandidátních genů a klinicko-patologickými daty pacientek s karcinomem prsu a ovaria

V rámci předkládané diplomové práce bylo provedeno vyhodnocení vztahů exprese sledovaných genů (*ABCC3*, *CPS1*, *TRIP6*) s klinickými daty pacientek, prognostickými faktory a léčebnou odpovědí s cílem nalezení asociací mezi expresí zmíněných genů a některou z charakteristik pacientek. Do studie bylo zařazeno celkem 113 vzorků tkání pacientek s karcinomem ovaria a 88 vzorků tkání pacientek s diagnostikovaným prsním karcinomem. Pro pacientky s karcinomem ovaria bylo k dispozici rovněž 17 vzorků kontrolní benigní ovariální tkáně bez přítomnosti nádorových buněk. Veškeré použité klinicko-patologické charakteristiky pacientek s ovariálními a prsními karcinomy zařazenými ve studii jsou shrnuty v následujících **Tabulkách č. 22 a 23**.

**Tabulka 22:** Vybraná klinicko-patologická data souboru pacientek s karcinomem ovaria (n = 113)

| Charakteristika u karcinomu ovaria |                                       | Počet<br>pacientek | Podíl pacientek<br>[%] |
|------------------------------------|---------------------------------------|--------------------|------------------------|
| Stádium<br>onemocnění              | I                                     | 8                  | 7,1                    |
|                                    | II                                    | 11                 | 9,7                    |
|                                    | III                                   | 83                 | 73,4                   |
|                                    | IV                                    | 9                  | 8,0                    |
|                                    | neznámo                               | 2                  | 1,8                    |
| Histologický typ<br>národu         | HGSC (High Grade Serous<br>Carcinoma) | 90                 | 79,6                   |
|                                    | Ostatní                               | 21                 | 18,6                   |
|                                    | neznámo                               | 2                  | 1,8                    |
| Histologický grade<br>onemocnění   | 1                                     | 7                  | 6,2                    |
|                                    | 2                                     | 18                 | 15,9                   |
|                                    | 3                                     | 87                 | 77,0                   |
|                                    | neznámo                               | 1                  | 0,9                    |
| Průměrný věk v<br>době diagnózy    | 59,8 ± 10,8                           |                    |                        |
| Chemoterapie                       | Neoadjuvantní chemoterapie            | 24                 | 21,2                   |
|                                    | Adjuvantní chemoterapie               | 89                 | 78,8                   |
| Použité terapeutické<br>režimy     | paclitaxel a platinové<br>deriváty    | 103                | 91,2                   |
|                                    | ostatní                               | 4                  | 3,5                    |
|                                    | neznámo                               | 6                  | 5,3                    |
| Odpověď na léčbu*                  | Platina-senzitivní                    | 70                 | 61,9                   |
|                                    | Platina-rezistentní                   | 23                 | 20,4                   |
|                                    | Částečně Platina-senzitivní           | 15                 | 13,3                   |
|                                    | neznámo                               | 5                  | 4,4                    |
| Progrese<br>onemocnění **          | ano                                   | 69                 | 61                     |
|                                    | ne                                    | 43                 | 38,1                   |
|                                    | neznámo                               | 1                  | 0,9                    |
| Úmrtí                              | ano                                   | 43                 | 38,1                   |
|                                    | ne                                    | 70                 | 61,9                   |

Poznámky: \*Odpověď na léčbu je u karcinomu ovaria je označena na základě tzv. Platinum-Free Intervalu (PFI) definovaného jako doba mezi ukončením léčby a progresí onemocnění (Kaye 2008). Délka PFI rozhoduje o dalším způsobu léčby a použití terapeutického režimu. Pacientky s ovariálním karcinomem jsou na základě PFI rozděleny na **Platina-rezistentní** (progrese onemocnění do šesti měsíců od ukončení adjuvantní léčby), **částečně platina-senzitivní** (progrese onemocnění v rozmezí 6-12 měsíců od ukončení adjuvantní léčby) a **Platina-senzitivní**, u nichž k případné progresi dochází až po 12 měsících od ukončení adjuvantní léčby. Této skupině pacientek je pak možno nasadit v dalších liniích stejný terapeutický režim. \*\*Progrese onemocnění byla sledována po celou dobu sledování pacientek, max. 3 roky po ukončení adjuvantní léčby.

Ve studovaném souboru patientek s karcinomem ovaria bylo přibližně 80 % patientek s rozvinutým onemocněním grade 3, stadia III-IV a histologického typu high-grade serózního karcinomu. Průměrný věk patientek byl 60 let. Z hlediska terapie byla 24 ženám poskytnuta neoadjuvantní chemoterapie před vlastním chirurgickým zákrokem, při kterém byly odebírány vzorky do studie. Naopak 89 patientkám byly odebrány vzorky před vlastní chemoterapeutickou léčbou v adjuvantním režimu. K terapii byly použity u naprosté většiny patientek (91,1 %) deriváty platiny v kombinaci s paclitaxelem. U 69 patientek došlo k progresi onemocnění po prodělané léčbě, 23 z nich je pak přímo rezistentních na léčbu tzn., že k progresi došlo nejpozději do půl roku od ukončení léčby. K úmrtí došlo v době sledování u 43 patientek.

**Tabulka 23:** Vybraná klinicko-patologická data souboru patientek s karcinomem prsu (n = 88)

| Charakteristika u karcinomu prsu |  | Počet patientek | Podíl patientek [%] |
|----------------------------------|--|-----------------|---------------------|
| Stadium onemocnění               | I  | 30              | 34,1                |
|                                  | II   | 54              | 61,4                |
|                                  | III  | 3               | 3,4                 |
|                                  | IV   | 1               | 1,1                 |
| Grade onemocnění                 | 1  | 12              | 13,6                |
|                                  | 2  | 56              | 63,6                |
|                                  | 3  | 18              | 20,5                |
|                                  | neznámo                                    | 2               | 2,3                 |
| Histologický typ nádoru          | invazivní duktální karcinom <i>in situ</i> | 2               | 2,3                 |
|                                  | invazivní duktální karcinom (IDCA)         | 72              | 81,8                |
|                                  | invazivní lobulární karcinom (ILCA)        | 11              | 12,5                |
|                                  | invazivní smíšený tubulární karcinom       | 3               | 3,4                 |
| Molekulární subtyp onemocnění    | Lumínální                                  | 62              | 70,5                |
|                                  | HER2 nelumínální                           | 11              | 12,5                |
|                                  | Trojitě negativní                          | 15              | 17,0                |
| Přítomnost metastáz              | ano  | 1               | 1                   |
|                                  | ne   | 87              | 99                  |
| Průměrný věk v době diagnózy     | 57±8,3                                     |                 |                     |
| Menopauza                        | ano  | 62              | 70                  |
|                                  | ne   | 23              | 26                  |
|                                  | neznámo                                    | 3               | 3                   |
| Exprese ER                       | pozitivní                                  | 83              | 94                  |
|                                  | negativní                                  | 5               | 6                   |
| Exprese PR                       | pozitivní                                  | 70              | 80                  |
|                                  | negativní                                  | 18              | 20                  |

| Charakteristika u karcinomu prsu |                    | Počet<br>pacientek | Podíl pacientek [%] |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Exprese HER2                     | pozitivní          | 24                 | 27                  |
|                                  | negativní          | 64                 | 73                  |
| Exprese Ki-67 [%]                | vysoká (nad 13 %)  | 75                 | 85                  |
|                                  | nízká (pod 13 %)   | 12                 | 14                  |
|                                  | neznámo            | 1                  | 1                   |
| Terapie                          | chemoterapie       | 88                 | 100                 |
|                                  | radioterapie       | 82                 | 93                  |
|                                  | hormonální terapie | 72                 | 82                  |
| Použitá<br>chemoterapeutika      | 5-fluorouracil     | 20                 | 23                  |
|                                  | anthracyklin       | 86                 | 98                  |
|                                  | cyklofosfamid      | 85                 | 97                  |
|                                  | taxany             | 19                 | 22                  |
| Progrese onemocnění              | ano                | 6                  | 7                   |
|                                  | ne                 | 79                 | 90                  |
|                                  | neznámo            | 3                  | 3                   |
| Úmrtí                            | ano                | 7                  | 8                   |
|                                  | ne                 | 78                 | 89                  |
|                                  | neznámo            | 3                  | 3                   |

Oproti kohortě pacientek s karcinomem ovaria, se v případě pacientek s karcinomem prsu jednalo v drtivé většině (95 %) o méně rozvinuté onemocnění ve stadiu I–II. Histologicky šlo u 81,1 % pacientek o invazivní duktální karcinom. Průměrný věk pacientek byl 57 let. Více než dvě třetiny pacientek byly ER a PR pozitivní, 24 pacientek mělo pozitivní stav exprese HER2 receptoru. Marker proliferace nádoru Ki-67 byl detekován u 85 % pacientek. Pacientky byly léčeny v adjuvantním režimu a vzorky nádorů od nich byly získány před léčbou. V adjuvantním typu chemoterapie byly použity zpravidla režimy kombinující antracykliny a cyklofosfamid (97 %), 19 ženám byly nasazeny rovněž taxany. K progresi onemocnění došlo u šesti pacientek a sedm pacientek ze sledované kohorty v průběhu sledování zemřelo.

Významné rozdíly v expresi genů *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* v jednotlivých typech nádorových vzorků a tkání byly hodnoceny pomocí softwaru REST2009 (Qiagen) s využitím Ct hodnot analyzovaných expresí. Pro stanovení vztahů expresního profilu genů *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* s klinickými daty obou sledovaných kohort pacientek byly exprese kandidátních genů nejprve normalizovány vůči expresím referenčních genů a ke statistickému hodnocení pak bylo využito programu SPSS v16.0. V prvním kroku byla u analyzovaných expresních výstupů ověřena distribuce dat pomocí Kolmogorov-Smirnova testu normality rozložení dat. Dle očekávání normalizované exprese

vykazovaly významné odchylky od normální rozložení, a proto byly pro jejich statistické zhodnocení použity neparametrické testy. Konkrétně Spermanův test pro nalezení signifikace vzájemné exprese kandidátních genů, jak je již zmíněno v kapitole 4.3.6 a také pro analýzu vztahu mezi expresí kandidátních genů a expresí Ki-67 a věkem v době diagnózy. Pro zbylé faktoriální veličiny byly zvoleny neparametrické testy v závislosti na počtu parametrů. Pro hodnocení dat s více než dvěma parametry byl využit Kruskal-Wallis test a data s pouze dvěma parametry byly analyzovány pomocí Mann-Whitneyho testu. Data, která vykazovala signifikanci byla následně analyzována Anova testem pro určení směru závislosti. Veškeré významné vztahy odhaleny pomocí zmíněných testů jsou shrnuty v **Tabulce č. 24 a 25**.

Pro kohortu pacientek s karcinomem ovaria byl sledovaný soubor rozdělen na dvě skupiny. Do první skupiny byly zařazeny pacientky s prodělanou neoadjuvantní léčbou, od kterých byly k dispozici vzorky až po léčbě ( $n = 24$ ) a druhou skupinu pak tvořily pacientky, od kterých byl získán vzorek nádoru při chirurgickém výkonu před nastolením chemoterapeutické léčby v adjuvatním režimu ( $n = 89$ ). U obou skupin pacientek s karcinomem ovaria byla genová exprese v nádorové tkáni porovnávána s expresí v nenádorové ovariální tkáni ( $n = 17$ ). Hladina exprese genů *TRIP6* a *CPS1* byla velmi významně snížena v nádorové ovariální tkáni oproti nenádorové ovariální tkáni, a to jak ve vzorcích nádorů před léčbou, tak po léčbě (**Tabulka č. 24**). Exprese mRNA *ABCC3* byla naopak významně zvýšena u karcinomu ovaria před léčbou oproti nenádorové tkáni. Tento efekt ovšem nebyl pozorován ve vzorcích po léčbě, kde již byla úroveň exprese genu *ABCC3* na stejné úrovni jako v nenádorové ovariální tkáni. Výsledek naznačuje možnou deregulaci genové exprese *ABCC3* podanou chemoterapeutickou léčbou.

**Tabulka 24:** Významné změny genové exprese *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* mezi nádorovou ovariální tkání před léčbou ( $n = 24$ ), po léčbě ( $n = 89$ ) a nenádorovou ovariální tkání ( $n = 17$ ).

| Gen          | Karcinom ovaria před léčbou vs. nenádorová ovariální tkáň | Karcinom ovaria po léčbě vs. nenádorová ovariální tkáň |
|--------------|---|--|
| <i>ABCC3</i> | Zvýšená exprese*  | NS   |
| <i>CPS1</i>  | Snížená exprese***  | Snížená exprese***                                     |
| <i>TRIP6</i> | Snížená exprese***  | Snížená exprese***                                     |

NS = nesignifikantní rozdíl v expresi  
p-hodnoty hladiny významnosti byly stanoveny pomocí software REST2009 (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).



Při porovnání expresí sledovaných genů ve skupině nádorových vzorků před léčbou oproti vzorkům po léčbě, nebyly nalezeny významné rozdíly. Stejně tak nebyly nalezeny žádné významné vztahy mezi expresí genů *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* se sledovanými klinicko-patologickými parametry jako je grade či stadium onemocnění, histologický typ nádoru, věk pacientek či úmrtí a odpověď na léčbu hodnocená na základě PFI kritéria.

U pacientek s karcinomem prsu byla obdobným způsobem porovnávána exprese *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* s klinickými daty jako je grade či stadium onemocnění, histologický typ nádoru, věk pacientek, exprese receptoru pro ER a PR či HER2 a Ki-67 markeru nebo úmrtí a progresu onemocnění, jak je uvedeno v **Tabulce č. 25**. S prognostickými údaji nebyl nalezen žádný významný vztah s hladinami exprese sledovaných genů.

**Tabulka 25:** Významné vztahy mezi expresí kandidátních genů a klinicko-patologickými charakteristikami souboru pacientek s nádory prsu (n = 88)

| Charakteristika     | Gen         | p-hodnota* |
|---------------------|-------------|------------|
| Terapie tamoxifenem | <i>CPS1</i> | 0,020      |
| Terapie herceptinem |             | 0,046      |

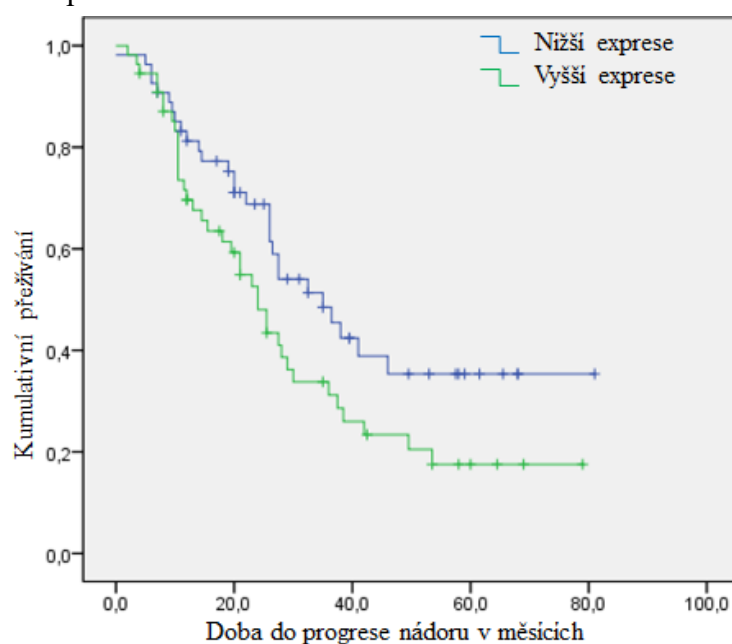
\*p-hodnota značí hladinu významnosti stanovenou v programu SPSS v16.0 pomocí neparametrických testů (Mann-Whitney, Kruskal-Wallis)

Jedinými významnými vztahy byla souvislost exprese genu *CPS1* s použitými terapeutickými režimy. Pacientky, které podstoupily hormonální léčbu tamoxifenem či herceptinem, měly vyšší hladinu *CPS1* než pacientky podstupující léčbu jen s využitím klasických chemoterapeutik. Jelikož se jedná o vzorky sbírané před použitím léčby, je tento údaj odrazem celkové charakteristiky karcinomu prsu, na základě, které jsou terapeutické režimy vybírány. V podstatě lze konstatovat, že pacientky určené k léčbě klasickou chemoterapií, měli nižší hladiny *CPS1*, než pacientky s charakteristikou karcinomu prsu určující zahrnutí hormonální a cílené biologické léčby.

### 5.1.3 Expresse kandidátních genů a přežívání pacientek s karcinomem prsu a ovaria

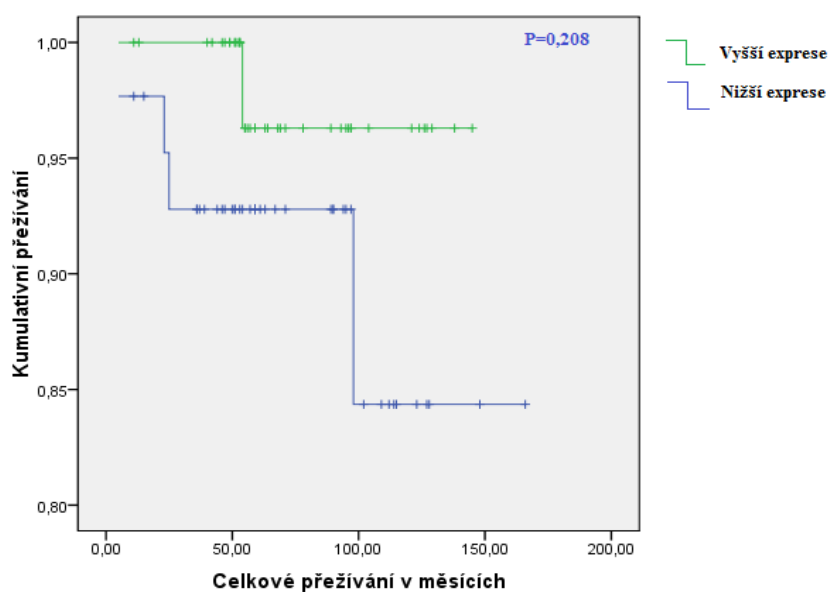
Po analýze souvislostí mezi klinicko-patologickými údaji pacientek s karcinomem ovaria a prsu a expresí genů *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6*, byla provedena i korelace mezi hladinami exprese těchto genů a odpovědí na použitou léčbu hodnocenou přežíváním pacientek zařazených do studie.

V kohortě pacientek s karcinomem ovaria bylo přežívání hodnoceno jako doba od ukončení léčby do progresse onemocnění („time to progression“, označovaná jako TTP) v měsících. V celém setu byl medián sledovaného TTP 22 měsíců a tento údaj byl dostupný pro 109 pacientek. Při vlastní analýze přežívání byly hladiny expresí nejprve rozděleny na základě mediánu na vzorky s vyšší a nižší expresí. K výpočtu vztahů genové exprese k přežívání byla použita Kaplan-Meierova metoda s Log rank testem významnosti. Ze studovaných genů byl nalezen významný vztah mezi přežíváním pacientek s karcinomem ovaria a expresí genu *CPS1*, jak je znázorněno na **Obrázku č. 21**. Patientky s vysokými hladinami exprese (nad medián), vykazovaly významně kratší přežití hodnocené jako TTP, než patientky s nižšími hladinami exprese *CPS1* (log rank test;  $p = 0,05$ ). Při přezkoumání tohoto vztahu na hranici významnosti Coxovou regresní analýzou adjustovanou ke stadiu, gradu onemocnění a histologickému typu nádoru, nebyl výsledek signifikantní a je proto nutné jeho ověření na nezávislém validačním souboru pacientek.



**Obrázek 21:** Vztah mezi expresí genu *CPS1* a dobou přežívání pacientek s karcinomem ovaria hodnocený pomocí Kaplan-Meierovy metody v programu SPSS v16.0. Patientky byly rozděleny základě mediánu exprese na patientky s vyšší expresí ( $n = 54$ ) vs. patientky s nižší expresí ( $n = 55$ ). Hladina významnosti byla určena pomocí log-rank testu ( $p = 0,05$ ).

V kohortě pacientek s karcinomem prsu, bylo na základě dostupných klinicko-patologických dat u 87 pacientek provedeno zhodnocení celkového přežívání pacientek (overall survival) jako doba od operace do poslední kontroly či úmrtí. Obdobně bylo u 86 pacientek stanoveno i bezpříznakové přežívání (progression free survival), tedy doba od operace do poslední kontroly či progrese onemocnění. Oba zmíněné parametry byly vyjádřeny v měsících. Před samotnou analýzou byly hodnoty expresí kandidátních genů rozděleny opět na základě mediánu na vzorky s vysokou a nízkou expresí. Takto připravená data byla analyzována pomocí Kaplan-Meierovy metody s testem významnosti Log rank. Pro studované kandidátní geny nebyl nalezen s přežíváním u karcinomu prsu žádný významný vztah, nicméně v případě genu *ABCC3* byl pozorován trend vyšších hladin exprese *ABCC3* s delším celkovým přežíváním pacientek s karcinomem prsu, jak je znázorněno **Obrázku č. 22**. Tento zajímavý potenciální vztah bude nutno ovšem stanovit a případně ověřit na větším validačním nezávislém souboru.



**Obrázek 22:** Znázornění expresních hladin genu *ABCC3* vůči celkovému přežívání pacientek s karcinomem prsu hodnocené pomocí Kaplan-Meierovy metody v programu SPSS v16.0. Patientky byly rozděleny základě mediánu exprese na pacientky s vyšší expresí (n = 44) vs. pacientky s nižší expresí (n = 43). Hladina významnosti ( $p < 0,05$ ) byla určována pomocí log-rank testu.

#### 5.1.4 Exprese miRNA s cílovým genem *ABCC3* u pacientek s karcinomem prsu

Dalším cílem diplomové práce bylo zavedení metodiky stanovení exprese konkrétních miRNA jako důležitých regulátorů exprese jejich cílových genů na posttranskripční úrovni. Deregulace či poruchy v expresi miRNA mohou mít zásadní dopad na expresi jejich cílových mRNA. V předkládané diplomové práci jsme se při zavádění metody stanovení exprese miRNA zaměřili na stanovení miRNA s cílovým genem *ABCC3* u vzorků karcinomu prsu, jelikož byl nalezen zajímavý vztah exprese tohoto genu s přežíváním pacientek s karcinomem prsu. Ke stanovení miRNA byly využity vzorky celkové RNA izolované v předchozích krocích, jak je popsáno detailně v kapitole 4.3.1.1 a 4.3.1.2. Následně byla syntetizována cDNA již specificky pro konkrétní miRNA a ve vzorcích takto připravené cDNA byla pomocí TaqMan MicroRNA Expression Assay stanovena exprese samotných miRNA pomocí real-time PCR. Celý proces je detailně popsán v kapitolách 4.3.3.1 a 4.3.5.

Jako miRNA cílící na gen *ABCC3* byla vybrána miRNA-665 (hsa-miR-665, miR-665) a to na základě *in silico* analýzy dostupných databází miRDB, miWalk a microT-CDS (Chen a Wang 2020; Liu a Wang 2019). V použitých databázích byla miR-665 vyhodnocena jako miRNA se silnou vazbou k 3'UTR oblasti genu *ABCC3* s potenciálním ovlivněním jeho exprese. Zvolená miRNA-665 sestává z 20 nukleotidů s následující sekvencí:

**5' - accaggaggcugagggcccu - 3'**

Stanovení miRNA bylo provedeno na setu 30 vzorků karcinomů prsu, do kterého byly zařazeny vzorky pacientek, jež byly vybrány k terapii taxany či měly nejvyšší nebo naopak nejnížší hladinu genu *ABCC3*. Set byl doplněn o vzorky, kde byla k dispozici také párová nenádorová prsní tkáň (n = 3). Ve vzorcích cDNA byl nejprve smícháním 15 náhodně vybraných vzorků vytvořen směsný kalibrátor a následně ředící řada pro stanovení účinnosti qPCR. Výsledná účinnost reakce pro U6-snRNA a miRNA-665 je popsána v **Tabulce. č. 26**. Pro Taqman Gene Expression Assays je doporučována účinnost v rozmezí 0,85–1,00. Účinnost obou použitých esejí odpovídala zadanému rozmezí a mohly být využity pro stanovení exprese miRNA-665 s referenční U6-snRNA.

**Tabulka 26:** Účinnost PCR reakce pro U6-snRNA a miRNA-665

| Gen       | Účinnost | R <sup>2</sup> |
|-----------|----------|----------------|
| U6-snRNA  | 1,00     | 0,964          |
| miRNA-665 | 0,92     | 0,970          |

Na zvoleném setu prsních karcinomů ( $n = 30$ ) a vzorků nenádorové tkáně ( $n = 3$ ) bylo provedeno stanovení genové exprese miRNA-665 i referenční U6-snRNA pomocí real-time PCR s následným vyhodnocením korelace s mRNA ABCC3 a klinicko-patologickými daty pacientek pomocí  $\Delta\Delta C_t$  metody. Stanovení exprese proběhlo úspěšně, referenční U6-snRNA byla detekována ve všech sledovaných vzorcích. Oproti tomu v celkovém počtu 30 vzorků byla prokázána exprese miRNA-665 pouze u 6 vzorků nádorové tkáně a ve 2 vzorcích nenádorové tkáně. Hodnoty normalizované relativní exprese miRNA-665 v nádorové a nenádorové tkáni byly porovnány, jednotlivé rozdíly jsou popsány v **Tabulce č. 27**. U obou vzorků, kde bylo možno nádorovou a nenádorovou prsní tkáň porovnat, byla zjištěna pomocí softwaru REST2009 významně vyšší exprese miRNA-665 v nádorové tkáni oproti prsní nenádorové tkáni ( $p < 0.001$ ). Tento výstup je v souladu s potenciální negativní regulací exprese ABCC3, protože pro oba tyto vzorky byla exprese ABCC3 naopak nižší, jak je uvedeno v **Tabulce č. 27**.

**Tabulka 27:** Porovnání změn relativní genové exprese ABCC3 a miRNA-665 mezi nádorovou ( $n = 3$ ) a nenádorovou prsní tkání ( $n = 3$ )

| Vzorek | Relativní exprese miRNA 665 | Změna exprese      | Relativní exprese ABCC3 | Změna exprese      |
|--------|-----------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|
| P21T   | <i>bez exprese</i>          | -                  | 1,371                   | ↑ v nádorové tkáni |
| P21V   |                             |                    | 0,522                   |                    |
| Z42T   | 14,059                      | ↑ v nádorové tkáni | 0,353                   | ↓ v nádorové tkáni |
| Z42V   | 0,002                       |                    | 0,388                   |                    |
| Z183T  | 0,929                       | ↑ v nádorové tkáni | 0,152                   | ↓ v nádorové tkáni |
| Z183V  | 0,001                       |                    | 0,253                   |                    |

Následně byla porovnávána exprese miRNA-665 s expresí genu ABCC3 v nádorové prsní tkáni sledovaného souboru pomocí neparametrického Spearmanova testu. Z **Tabulky č. 28** je patrné, že nebyl odhalen žádný významný vztah mezi expresí miRNA-665 a ABCC3, nicméně je nutno vzít v potaz malý počet vzorků v souboru. V rámci hledání souvislostí s klinicko-patologickými daty pacientek, jejich přežíváním a expresí miRNA-665, nebyl nalezen pro miRNA-665 žádný významný vztah a tato miRNA pravděpodobně nemá vliv na prognózu či progresi karcinomu prsu, ovšem jedná se o data získaná na velmi malém počtu vzorků.

**Tabulka 28:** Korelační koeficient a hladina významnosti vzájemného porovnání exprese miRNA-665 a *ABCC3* ve vzorcích prsního karcinomu (n = 30)

|              | miRNA 665 |
|--------------|-----------|
| <i>ABCC3</i> | 0,154     |
| $\rho$       | 0,427     |
| $p$          |           |

## 5.2 *In vitro* studie

Druhým cílem předkládané diplomové práce byla studie *in vitro*, v rámci které byla porovnána účinnost konvenčního taxanu paclitaxelu (PCT) a čtyř nových taxanových derivátů SB-T experimentální řady 1216 (SB-T-1216, SB-T-121602, SB-T-121605, SB-T-121606) v senzitivních a paclitaxel-rezistentních experimentálních nádorových ovariálních buněčných liniích SKOV3/S a SKOV3/PCT-RES (SKOV3/R). Získané účinné dávky taxanů pak byly využity k jejich aplikaci v uvedených nádorových buňkách SKOV3/S a SKOV3/R. Součástí *in vitro* studie bylo i stanovení transkriptů *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* v senzitivních SKOV3/S a vůči paclitaxelu rezistentních SKOV3/PCT-RES (SKOV3/R) liniích karcinomu ovaria s cílem zjistit případné rozdíly v genové expresi mezi buňkami s rozdílnou citlivostí na taxany. V závěru byly také studovány změny expresního profilu genu *CPS1* před a po ošetření konvenčním taxanem paclitaxelem a novými taxanovými SBT deriváty. Cílem bylo odhalit případné deregulace exprese tohoto genu způsobené aplikací taxanů.

### 5.2.1 Porovnání účinnosti paclitaxelu a nových taxanových SBT derivátů v senzitivních a rezistentních liniích karcinomu ovaria

Nejprve byla studována a porovnávána účinnost konvenčního taxanu paclitaxelu a nových derivátů taxanů (SB-T-1216, SB-T-121602, SB-T-121605 a SB-T-121606) v senzitivních (SKOV3/S) a vůči paclitaxelu rezistentních (SKOV3/R) buněčných liniích karcinomu ovaria. Účinnost byla porovnávána stanovením jejich cytotoxicity a hodnoty  $IC_{50}$  pomocí fluorescenčního měření po 72hodinové inkubaci buněk s taxany nebo bez inkubace. Rozsah použitých koncentrací taxanů byl v rozmezí 0.003 nM–50  $\mu$ M. Získaná data byla analyzována v programu GraphPad 6.0 (Prims). Stanovení bylo provedeno ve třech nezávislých experimentech pro obě buněčné linie a jednotlivé taxany. Výsledná  $IC_{50}$  je tedy vyjádřena jako průměr těchto tří stanovení se směrodatnou odchylkou v **Tabulce č. 29**.

**Tabulka 29:** Průměrné hodnoty  $IC_{50}$  se směrodatnou odchylkou ( $n = 3$ ) v senzitivní (SKOV3/S) a rezistentní (SKOV3/R) buněčné linii ovariálního karcinomu po aplikaci taxanů spolu s koeficientem determinace ( $R^2$ )

| $IC_{50}$ [nM]     | SKOV3/S           | $R^2$   | SKOV3/R              | $R^2$   |
|--------------------|-------------------|---------|----------------------|---------|
| <b>PCT</b>         | $38,23 \pm 5,85$  | $0,996$ | $4565,20 \pm 123,03$ | $0,997$ |
| <b>SB-T-1216</b>   | $26,97 \pm 16,13$ | $0,996$ | $12,98 \pm 0,76$     | $0,997$ |
| <b>SB-T-121602</b> | $13,10 \pm 1,20$  | $0,997$ | $13,24 \pm 1,40$     | $0,99$  |
| <b>SB-T-121605</b> | $7,19 \pm 1,94$   | $0,994$ | $10,82 \pm 0,65$     | $0,983$ |
| <b>SB-T-121606</b> | $4,85 \pm 0,81$   | $0,992$ | $11,55 \pm 3,62$     | $0,994$ |

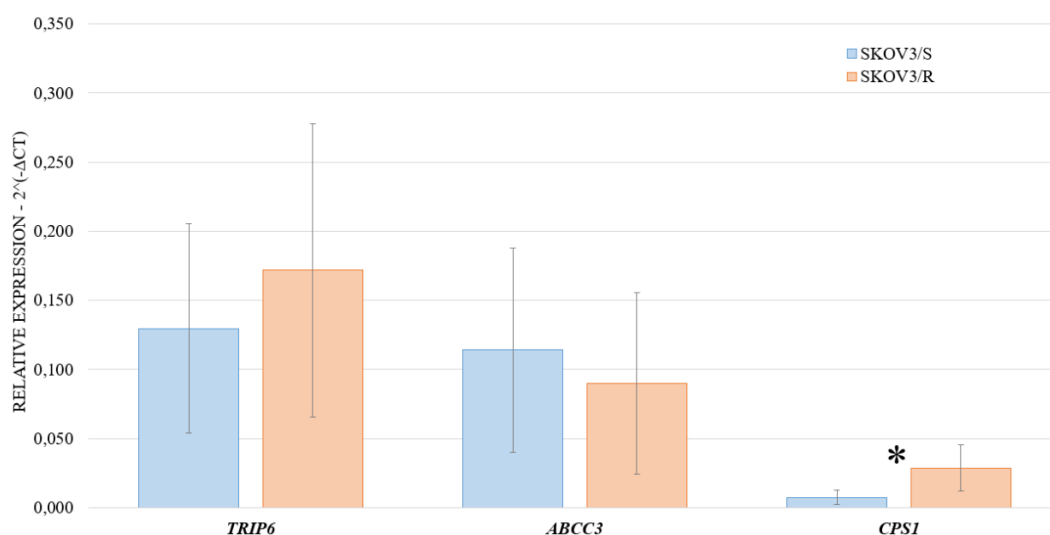
Z výsledků uvedených v **Tabulce č. 29** je patrné, že jak paclitaxel, tak všechny nové deriváty taxanů jsou velmi účinné v senzitivních buňkách karcinomu ovaria a to celkově v rozmezí hodnot  $IC_{50}$  4,9 nM–38,2 nM. V paclitaxel-rezistentních buňkách karcinomu ovaria byla potvrzena rezistence vůči paclitaxelu, protože k dosažení hodnoty  $IC_{50}$  bylo nutno použít koncentraci přes 4,5  $\mu$ M. Oproti tomu všechny nové deriváty taxanů byly mnohonásobně (až 423x) účinnější s velmi podobnými hodnotami  $IC_{50}$  (10,8 nM–13,2 nM). Taxany SB-T-121605 a SB-T-121606 vykazují nepatrně vyšší účinnost než jejich předchůdce SB-T-1216, od kterého jsou strukturně odvozeny. Výjimkou je taxan SB-T-121602, který je obdobně účinný jako SB-T-1216. Získané hodnoty  $IC_{50}$  sloužily k výběru koncentrací příslušného taxanu pro inkubaci buněk karcinomu ovaria s taxany a následné sledování změn genetického expresního profilu kandidátních genů *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* vlivem působení taxanů v obou typech studovaných buněčných linií.

### 5.2.2 Exprese kandidátních genů v senzitivních a rezistentních liniích karcinomu ovaria

Pro stanovení míry genové exprese kandidátních genů *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* byla nejprve provedena izolace RNA ze vzorků rezistentních a senzitivních buněčných linií karcinomu ovaria, která byla následně pomocí reverzní transkripce přepsána na cDNA. Samotná analýza genové exprese byla provedena pomocí real-time PCR na přístroji ViiA7. Porovnání exprese *ABCC3*, *TRIP6* a *CPS1* mezi senzitivní a rezistentní linií karcinomu ovaria bylo provedeno na kontrolních vzorcích bez aplikace taxanů. Pro potřeby tohoto porovnání byly naměřené hodnoty exprese kandidátních genů v duplikátech normalizovány vůči referenčním genům metodou  $\Delta\Delta Ct$ , která je detailně popsána v kapitole 4.4.4. Takto zpracovaná data byla následně analyzována

parametrickým t-testem pro nalezení signifikace ( $p < 0,05$ ) mezi změnou relativní exprese v rámci rezistentní a senzitivní buněčné linie.

Z Obrázku č. 23 je patrné, že všechny sledované kandidátní geny (*ABCC3*, *CPS1*, *TRIP6*) byly ve vzorcích senzitivních i rezistentních buněčných linií exprimovány. V obou liniích byl obdobně jako ve vzorcích karcinomů ovaria nejvíce exprimován gen *TRIP6* následovaný genem *ABCC3* a *CPS1*. Významná změna relativní exprese mezi senzitivní a rezistentní linií karcinomu ovaria byla zaznamenána pouze u genu *CPS1*. V tomto případě byla prokázána významně vyšší exprese *CPS1* v rezistentní buněčné linii oproti senzitivní linii karcinomu ovaria ( $p = 0,034$ ), která nasvědčuje možnému významu tohoto genu v rozvoji rezistence. Vzhledem k potenciálnímu významu tohoto genu v klinických vzorcích ovariálního karcinomu, byla dále detailně sledována právě možná deregulace exprese tohoto genu vlivem aplikace taxanů v buňkách karcinomu ovaria, jak uvádí následující kapitola.



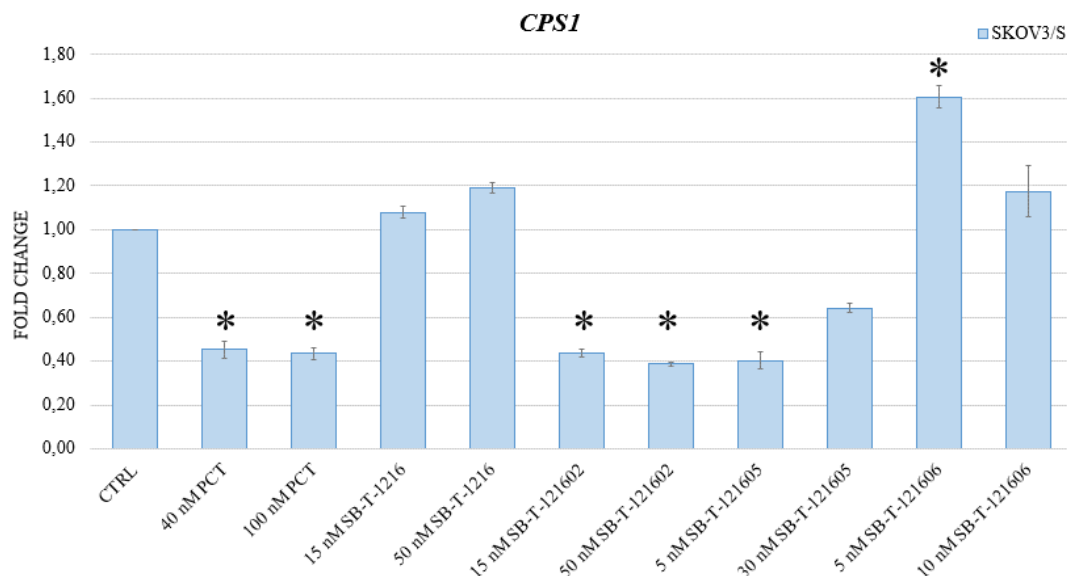
**Obrázek 23:** Porovnání relativní exprese genů *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* v senzitivních a rezistentních buňkách karcinomu ovaria. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ze tří nezávislých měření se směrodatnými odchylkami. Signifikance byla určena pomocí parametrického t-testu s hladinou významnosti  $*p < 0,05$ .



### 5.2.3 Vliv taxanů na expresi *CPSI* v senzitivních a rezistentních liniích karcinomu ovaria

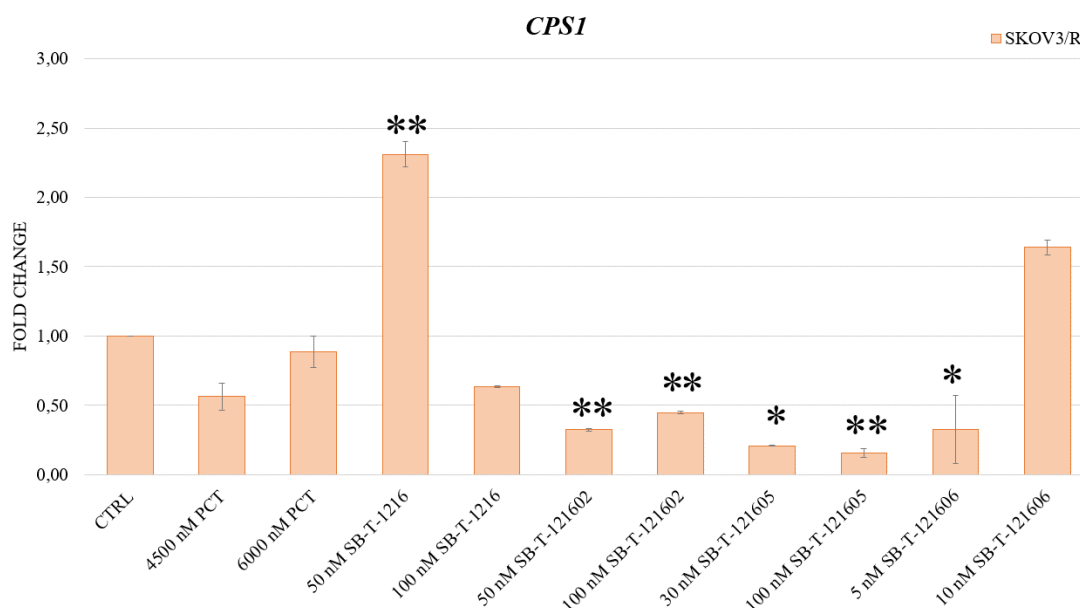
Vliv paclitaxelu a nových taxanových derivátů (SB-T-1216, SB-T-121602, SB-T-121605 a SB-T-121606) na expresi *CPSI* byl sledován na vzorcích senzitivních SKOV3/S a rezistentních SKOV3/R buněčných linií karcinomu ovaria, které byly na základě stanovených hodnot  $IC_{50}$  inkubovány v médiu s adekvátní koncentrací příslušného taxanu po dobu 48 hodin. Koncentrace taxanů byly pro tyto experimenty vybrány jednak na základě  $IC_{50}$ , ve kterých byly v daných liniích účinné a dále byly použity u každého taxanu i jeho vysoce efektivní dávky převyšující hodnotu  $IC_{50}$ . Po sklizení, izolaci a syntéze cDNA bylo provedeno měření genové exprese *CPSI* stejně jako v předchozích případech pomocí real-time PCR na přístroji ViiA7. Všechny vzorky byly stanoveny ve dvou měřeních a výsledné hodnoty relativní genové exprese jsou uvedeny jako průměrná hodnota s odchylkou obou stanovení. Získané hodnoty expresí byly vyhodnoceny metodou  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , jak je popsáno v kapitole 4.4.4 vždy pro konkrétní taxan a danou buněčnou linii.

Nejprve byla stanovena a zhodnocena exprese *CPSI* v senzitivní SKOV3/S linii karcinomu ovaria a její případné změny dané aplikací sledovaných taxanů. Bylo zde nalezeno hned několik významných vztahů mezi změnou exprese u kontrol a vzorků ošetřených taxany, které naznačují potencionální souvislost mezi aplikací taxanů a změnou exprese *CPSI*. Z **Obrázku č. 24** je patrné, že u většiny sledovaných taxanů docházelo po jejich aplikaci ke snížení exprese genu *CPSI*. Významné snížení exprese tohoto genu bylo pomocí parametrického t-testu odhaleno u obou koncentrací konvenčního taxanu paclitaxelu (40 nM a 100 nM) a také u taxanových derivátů SB-T-121602 (15 nM a 50 nM) a SB-T-121605 (5 nM). Oproti tomu působením taxanových derivátů SB-T-1216 a SB-T-121606 došlo k nárůstu exprese genu *CPSI* v senzitivních buňkách ovariálního karcinomu. Tento výsledek naznačuje rozdílné ovlivnění genové exprese působením taxanů v závislosti na jejich struktuře.



**Obrázek 25:** Porovnání změn exprese genu *CPS1* v rámci senzitivní linie karcinomu ovaria SKOV3/S před (CTRL) a po aplikaci jednotlivých taxanů v uvedených koncentracích s označením signifikantních vztahů vyhodnocených pomocí t-testu s hladinou významnosti \* $p < 0,05$  či \*\* $p < 0,01$ .

Stejným způsobem bylo provedeno hodnocení exprese *CPS1* a její případné změny vyvolané aplikací taxanů v rezistentní SKOV3/R linii karcinomu ovaria. Jak je uvedeno na **Obrázku č. 25**, v SKOV3/R buňkách dochází opět ke snížení exprese genu *CPS1* a to především ve vzorcích ošetřených taxanovými deriváty SB-T-121602 a SB-T-121605, kde je pokles exprese velmi významný. Ve vzorcích ošetřených paclitaxelem je rovněž naznačena snížená exprese *CPS1* i když není významná. Pouze SB-T-121606 vede ve vyšší efektivní koncentraci k významnému zvýšení exprese *CPS1*, stejně jako SB-T-1216, ovšem ten pouze v koncentraci 50 nM.



**Obrázek 24:** Porovnání změn exprese genu *CPS1* v rámci rezistentní linie karcinomu ovaria SKOV3/R před (CTRL) a po aplikaci jednotlivých taxanů v uvedených koncentracích s označením signifikantních vztahů vyhodnocených pomocí t-testu s hladinou významnosti \* $p < 0,05$  či \*\* $p < 0,01$ .

Obecně tedy vlivem aplikace taxanů v buňkách karcinomu ovaria dochází ke snížení exprese genu *CPSI*, kromě aplikace taxanů SB-T-1216 a jeho derivátu SB-T-12606, které naopak expresi *CPSI* zvyšují. V případě taxanu SB-T-121606 přitom k navýšení exprese genu *CPSI* dochází již po působení velmi malých dávek (10 nM). Klasické taxany využívané v chemoterapii i jejich potenciálně použitelné nové syntetické SBT deriváty pravděpodobně velmi významně ovlivňují expresi jednoho z kandidátních genů *CPSI* s potenciální úlohou v rezistenci či účinnosti léčby karcinomu ovaria.

## 6 Diskuze

Celosvětově jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí nádorová onemocnění. V ženské populaci je nejčastějším maligním onemocněním karcinom plic a hned druhou nejčastější malignitou je karcinom prsu. U gynekologických malignit je pak nejzávažnějším onemocněním s nejvyšší mortalitou karcinom ovaria. Karcinomy prsu a ovarií jsou charakteristické vysokou heterogenitou, která značně komplikuje nejen jejich včasné odhalení ale i následnou léčbu. Za nejvýznamnější překážku a zároveň limitující faktor terapie těchto karcinomů je považována rezistence nádorových buněk vůči podaným cytostatikům, která zhoršuje léčebnou odpověď a umožňuje další progresi nádoru. Tato rezistence vzniká na podkladě celé řady faktorů a adaptivních mechanismů, které jsou v současné době intenzivně studovány. Jako potencionální biomarkery související s rezistencí nádorových buněk prsního a ovariálního karcinomu byly v předchozích studiích v rámci spolupráce Oddělení Toxikogenomiky SZÚ a výzkumného pracoviště 3. LF UK identifikovány molekuly *TRIP6*, *ABCC3* a enzym *CPS1*, které hrají důležitou roli v transportu, metabolismu a migraci nádorových buněk.

Studium těchto kandidátních molekul bylo hlavním předmětem diplomové práce. Jejich úloha byla studována v souvislosti s prognózou, rozvojem rezistence a léčebnou odpovědí v kohortách pacientek s karcinomem ovaria a prsu s cílem stanovit jejich prognostický a prediktivní význam. Zároveň byla metodami *in vitro* studována úloha genů *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* ve vztahu k rezistenci vůči taxanům na modelech senzitivních a paclitaxel-rezistentních buněk karcinomu ovaria. Cílem bylo odhalení případných změn v jejich expresním profilu v souvislosti s rezistencí a také po podání taxanů a jejich derivátů.

### 6.1 Klinická část studie

#### 6.1.1 Studie genové exprese *ABCC3*, *CPS1*, *TRIP6* u pacientek s karcinomem ovaria a prsu

Pro studium vztahů genové exprese s prognózou a léčebnou odpovědí u pacientek s karcinomem ovaria a prsu byly vybrány geny *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* a to na základě jejich potenciálního vztahu k rezistenci nádorových buněk, který byl identifikován v předchozích *in vitro* studiích na buňkách karcinomu prsu (Daniel *et al.* 2019; Wang *et al.* 2020). Detailní úloha těchto genů v prognóze a predikci léčebné odpovědi není u pacientek s karcinomem prsu a ovaria plně objasněna a proto bylo její studium jedním z hlavních cílů diplomové práce. Určení významu genů *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6*

v prognóze, rezistenci a léčebné odpovědi karcinomů ovaria a prsu bylo provedeno stanovením hladiny jejich transkriptů, které byly porovnány s klinicko-patologickými daty a přežíváním pacientek. K dispozici byly pro sledované kohorty pacientek kompletní klinicko-patologická data, charakterizace nádorů, údaje o použitých terapeutických režimech, léčebná odpověď a také přežívání pacientek. Soubory s takto detailní charakteristikou jsou svým složením dostatečné pro statistické hodnocení a získání pilotních relevantních výstupů měření. Ve všech vzorcích nádorové tkáně karcinomu ovaria (n = 113) a karcinomu prsu (n = 88) byla prokázána exprese sledovaných kandidátních genů, které byly rovněž exprimovány i ve všech vzorcích testované nenádorové ovariální tkáně (n = 17).

Z hlediska expresních hladin byl ve vzorcích nádorové tkáně ovariálního karcinomu nejvíce exprimován gen *TRIP6*, následovaný genem *ABCC3* a *CPS1*, jejichž expresní hladiny navzájem také významně korelovaly. Oproti tomu v prsní nádorové tkáni byl nejvíce exprimován gen pro enzym *CPS1* následovaný genem *ABCC3*. Naopak nejméně zde byl exprimován gen *TRIP6*. Tyto výsledky poukazují na značnou tkáňovou specifitu v expresi sledovaných genů, která je v souladu se známými údaji o expresi těchto genů a jejich rozdílech v různých typech lidských tkání. *TRIP6* byl na základě RNA sekvenování již detekován v řadě tkání, přičemž jeho nejvyšší hladiny byly nalezeny v endometriu či ledvinách a také v nenádorové ovariální tkáni (Fagerberg et al. 2014). Vysoké hladiny exprese tohoto genu byly pozorovány rovněž u jiných typů nádorů, např. u cervikálního karcinomu (Yang et al. 2020), nádorů gastrointestinálního traktu (Zhu et al. 2019; Zhao et al. 2017), nasofaryngeálního karcinomu, Ewingova sarkomu a glioblastomu (Miao et al. 2016; Grunewald et al. 2013; Lin et al. 2013). Nedávno byla prokázána také zvýšená exprese *TRIP6* u karcinomu prsu (Zhao et al. 2020). Membránový transportér *ABCC3* a metabolický enzym *CPS1* jsou exprimovány především v tkáních gastrointestinálního traktu. V ováriích je jejich bazální exprese poměrně nízká (Fagerberg et al. 2014). *ABCC3* je exprimován převážně v nádorech gastrointestinálního traktu, zejména v kolorektálním karcinomu, ale byl identifikován také v ovariální a prsní nádorové tkáni (Zhang et al. 2021; Kim et al. 2020; Svoboda et al. 2018; Balaji et al. 2016; Elsnerova et al. 2016; Kobayashi et al. 2016). Zvýšená exprese *CPS1* je pak typická především pro karcinom plic a hepatocelulární karcinom (Wu et al. 2020; Cancer Genome Atlas Research Network 2017).

Kromě samotných hladin exprese v nádorových tkáních, bylo možno v rámci studované kohorty pacientek s karcinomem ovaria porovnat expresi *ABCC3*, *TRIP6*, *CPS1* mezi nádorovou a nenádorovou ovariální tkání. Zároveň bylo provedeno porovnání exprese těchto genů v nenádorové tkáni ovaria s expresí ve vzorcích nádorové tkáně ovaria před (n = 24) a po léčbě (n = 89). V případě genů *TRIP6* a *CPS1* byly hladiny jejich exprese významně sníženy v nádorové ovariální tkáni oproti nenádorové ovariální tkáni a to jak u vzorků před léčbou tak i po léčbě. *TRIP6* a jeho rozdíly v ovariální nádorové a nenádorové tkáni nejsou známy. Na druhou stranu, u karcinomu prsu či glioblastomu byly nalezeny zvýšené exprese *TRIP6* související i s prognózou (Zhao et al. 2020; Miao et al. 2016; Grunewald et al. 2013; Lin et al. 2013). Nicméně v případě ovariální nádorové tkáně jsou celkově hladiny *TRIP6* již samy o sobě velmi vysoké a k jejich dalšímu navýšení u nádorové tkáně nedochází. Změny exprese *CPS1* mezi nádorovou a nenádorovou ovariální či prsní tkání dosud nejsou prostudovány a data získaná v rámci předkládané práce jsou pro tento gen velmi cenná. Pro *CPS1* byla doposud prokázána zvýšená exprese v nádorových buňkách a v buněčných liniích plicního adenokarcinomu (Wu et al. 2020.). Naopak snížená exprese *CPS1* byla zaznamenána u hepatocelulárního karcinomu s dalším následným snížením ve vzdálených metastázách (Ridder et al. 2021). Protichůdné výsledky v různých typech tkání jsou odrazem především rozdílných hladin exprese, které mezi jednotlivými tkáněmi jsou, jak ukazují i námi získaná data ve vzorcích ovariální a prsní tkáně.

Zajímavý efekt byl pozorován u exprese *ABCC3*, která byla významně zvýšena u karcinomu ovaria oproti nenádorové tkáni u vzorků před léčbou. U vzorků po léčbě byla exprese snížena na stejnou úroveň jako v nenádorové tkáni. Lze tedy usuzovat, že exprese *ABCC3* může být významně deregulována v důsledku podání chemoterapeutické léčby. Získané výsledky zvýšené exprese *ABCC3* u vzorků před léčbou u histologicky high grade serózního karcinomu potvrzují předchozí data získaná na Oddělení Toxikogenomiky SZÚ (Elsnerova et al. 2016) i zvýšenou expresí v maligní ovariální tkáni pozorovanou v práci Aunera a kol. (Auner et al. 2010). Deregulace genové exprese byla dosud za pomoci RNA sekvenování pozorována u genů *POU3F3*, *NKX6-1*, a *PROK1*, kde skupina pacientek (n = 10) bez neoadjuvantní léčby měla významně vyšší hladinu těchto genů než pacientky předléčené (n = 20) (Lee et al. 2020b). Další práce identifikovala skupinu genů významně deregulovaných chemoterapií (*E2F1*, *HIST1H3G*, *BRCA2*, *TTK*, *CCNA2*, *CCNB1*, *HIST1H3B*, *BRIPI*, *CDC7*, *CHEK1*) v setu 19 pacientek s karcinomem ovaria (Arend et al. 2018). Tyto změny genové exprese

po prodělání neoadjuvantní chemoterapie mohou mít velmi zásadní dopad pro nastavení další léčby a volbu optimálního terapeutického režimu zvláště v případě ovlivnění exprese genů souvisejících s účinností podávaných preparátů či ovlivňujících DNA reparační dráhy.

V další fázi studie byly hledány vztahy mezi genovou expresí *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* a klinicko-patologickými daty pacientek s karcinomem ovaria či prsu a jejich léčebnou odpovědí. V případě karcinomu ovarií však nebyla nalezena žádná významná souvislost s klinicko-patologickými daty pacientek. V souboru pacientek s karcinomem prsu byl nalezen jediný statisticky významný vztah mezi typem použité terapie a expresí *CPS1*. U pacientek podstupujících adjuvantní hormonální léčbu tamoxifenem či herceptinem v kombinaci s chemoterapeutiky byly pozorovány významně vyšší hladiny exprese *CPS1*, než u pacientek léčených pouze klasickými chemoterapeutiky. Jelikož analyzované vzorky karcinomu prsu byly získány ještě před zahájením léčby, lze konstatovat, že tato zvýšená exprese je přímou charakteristikou karcinomu prsu, kde jsou vyšší hladiny *CPS1* u pacientek určených k hormonální a cílené terapii.

V této části studie byl v kohortách pacientek s karcinomem prsu a ovarií analyzován pomocí Kaplan-Meierova testu i možný vztah mezi expresí *ABCC3*, *CPS1*, *TRIP6* a celkovým či bezpříznakovým přežíváním. V souboru pacientek s karcinomem prsu ( $n = 88$ ) nebyl nalezen žádný statisticky významný vztah míry exprese *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* s jejich celkovým či bezpříznakovým přežíváním. U 109 pacientek s karcinomem ovaria bylo mediánem přežívání, které bylo hodnoceno jako doba od ukončení léčby do progresu (TTP) 22 měsíců. V rámci této analýzy byl nalezen statisticky významný vztah u pacientek s vyššími hladinami exprese *CPS1* (nad medián) a signifikantně kratší dobou přežívání oproti pacientkám s nižší expresí *CPS1*. Vysoké hladiny *CPS1* se tak jeví jako negativní prognostický faktor. V literatuře lze v této souvislosti nalézt obdobná data. U rektálního karcinomu zvýšená hladina exprese enzymu *CPS1* souvisela s kratším bezpříznakovým přežíváním (Lee et al. 2014) stejně jako v práci Wu a kol. (Wu et al. 2020a), kde u pacientů s adenokarcinomem plic vedla zvýšená genová exprese *CPS1* ke kratšímu bezpříznakovému i celkovému přežívání. Naopak v dalších studiích u pacientů s karcinomem žaludku či hepatocelulárním karcinomem byl zaznamenán opačný výsledek, kdy nižší hladiny exprese *CPS1* korelovaly s významně kratší dobou přežívání (Fang et al. 2021; Ridder et al. 2021). Takto rozdílná deregulace *CPS1* může být způsobena epigenetickými

mechanismy ovlivňujícími jeho expresi, zejména DNA metylací, která je klíčovým mechanismem ovlivňujícím aktivitu CPS1 genu (*Liu et al. 2011*).

Souvislost mezi vyššími hladinami *CPS1* a kratším bezpříznakovým přežíváním pacientek s ovariálním karcinomem nalezené v naší studii Kaplan-Meierovým korelačním testem přímo na hladině významnosti nebyla potvrzena Coxovou regresí, a proto je nutné tento vztah určit a případně ověřit na dalším nezávislém souboru pacientek. V případě validace tohoto vztahu se jeví hladina exprese *CPS1* u pacientek s karcinomem ovaria jako vhodný prognostický faktor jejich přežívání. Výsledky získané v rámci diplomové práce na kohortě pacientek s karcinomem ovaria jsou natolik významné, že se staly součástí rukopisu v současné době odeslaného do revizního řízení mezinárodního impaktovaného odborného časopisu (**Příloha č. I**). CPS1 jako metabolický enzym účastní se močovinového cyklu hraje důležitou roli v metabolismu nádorových buněk, jelikož podílí na detoxikaci amoniaku. Kromě močovinového cyklu může v nádorových buňkách zajišťovat syntézu také pyrimidinu, který je nezbytný pro stimulaci proliferace. Na základě získaných výsledků a dostupných studií lze předpokládat, že zvýšená aktivita tohoto enzymu v nádorových buňkách pravděpodobně souvisí se zvýšenou produkcí amoniaku, který nádorové buňky mohou využívat jako alternativní zdroj dusíku pro syntézu nukleotidů a celkově vyšší hladiny amoniaku v těle vedou k letargii, anorexii, poruchám centrálního nervového systému či dokonce k úmrtí (*Garcia-Bermudez et al. 2020; Lie et al. 2019; Diez-Fernandez a Häberle 2017; Diez-Fernandez et al. 2013; Funghini et al. 2012*).

### **6.1.2 Zavedení metodiky stanovení exprese miRNA**

V rámci diplomové práce bylo jedním z cílů zavedení metodiky stanovení exprese miRNA pomocí real-time PCR. Pro zavedení této metodiky byla zvolena miRNA-665. Ta byla vybrána pomocí *in silico* analýzy dat v dostupných databázích (miRDB, miRWalk a microT-CDS), jelikož vykazuje silnou vazbu na gen *ABCC3* v 3'UTR oblasti s potenciálním ovlivněním jeho exprese. V dosavadních studiích byla experimentálně ověřena deregulace genové exprese *ABCC3* prostřednictvím miRNA-665 v myši linii RAW 264.7 (*Dalmaso et al. 2011*). Další zajímavé geny, na které miR-665 cílí jsou např. *CRIM1*, *AKT3* či jaderný receptor NR4A3. Cílením na *CRIM1* miRNA-665 přispívá k progresi karcinomu žaludku a EMT procesu a jeví se tedy jako potenciálně zajímavý terapeutický cíl (*Wu et al. 2020b*). Interakce miRNA-665 s *AKT3* či jaderným receptorem NR4A3, které byly prokázány (*Hu et al.*



2019; Zhao et al. 2019), mohou hrát důležitou roli v ovlivnění exprese těchto genů významných v tumorogenezi, invazivitě a tvorbě metastáz např. u karcinomu žaludku či prsu. V této diplomové práci výsledky získané sledování exprese *ABCC3* v kohortě pacientek s karcinomem prsu naznačily možnou souvislost s přežíváním, nicméně je potřeba tento vztah detailně prostudovat. Gen *ABCC3* je cílen celkově 27 miRNA, přičemž miRNA-665 má nejvyšší hodnotu komplementarity k *ABCC3* mRNA (<http://mirdb.org/>). Jako kontrolní miRNA využitá pro normalizaci exprese miRNA-665 byla zvolena U6, která je typem tzv. malé jaderná RNA (U6 small nuclear RNA; U6 snRNA). Tato RNA je přítomna uvnitř spliceosomu, je velmi stabilní a je to jeden z nejvyužívanějších referenčních genů pro sledování exprese miRNA (Didychuk et al. 2018).

Samotné zavedení metodiky bylo založeno na úspěšném stanovení účinnosti qPCR reakcí s využitím TaqMan miRNA expresních esejí pro referenční RNA i kandidátní miRNA. Na zvoleném setu prsních karcinomů ( $n = 30$ ) a vzorků nenádorové tkáně ( $n = 3$ ) bylo úspěšně provedeno stanovení genové exprese U6-snRNA a miRNA 665. Referenční U6-snRNA byla dle očekávání exprimována ve všech vzorcích, nicméně exprese kandidátní miRNA-665 byla zaznamenána pouze u 9 vzorků nádorové tkáně a 2 vzorků párové nenádorové tkáně. Pomocí softwaru REST2009 byla odhalena významně vyšší exprese miRNA-665 v nádorové tkáni oproti prsní nenádorové tkáni ( $p < 0,001$ ). Tento výsledek je v souladu s potenciální negativní regulací exprese *ABCC3*, jelikož u obou těchto vzorků byla exprese *ABCC3* naopak nižší. Výsledné hodnoty expresí byly porovnány s klinicko-patologickými daty pacientek, avšak bez nalezení statisticky významného vztahu. Jedná se však pouze o pilotní data získaná v rámci úspěšného zavedení metodiky exprese konkrétních miRNA. Pro získání validních a statisticky hodnotitelných dat z patientských kohort bude třeba provést stanovení na výrazně vyšším počtu vzorků.

## 6.2 In vitro studie

### 6.2.1 Účinnost paclitaxelu a SB-T taxanových derivátů v buněčných liniích karcinomu ovaria

V první části *in vitro* studie předkládané diplomové práce byla sledována a porovnána účinnost paclitaxelu a nových taxanových derivátů II. (SB-T-1216) a III. generace (SB-T-121602, SB-T-121605 a SB-T-121606) v senzitivních SKOV3/S a vůči paclitaxelu rezistentních SKOV3/PCT-RES (SKOV3/R) experimentálních nádorových buněčných liniích karcinomu ovaria. Hlavním cílem bylo zjistit, zda jsou nové taxanové deriváty účinnější než paclitaxel v rezistentních buňkách karcinomu ovaria. Toto porovnání bylo provedeno na základě hodnot  $IC_{50}$  pro jednotlivé taxany ve třech nezávislých experimentech v senzitivních i rezistentních buněčných liniích ovariálního karcinomu. Bylo zjištěno že taxany II. a III. generace jsou výrazně účinnější v rezistentních buněčných liniích karcinomu ovaria než paclitaxel. Mezi účinností jednotlivých zástupců II. a III. generace nebyl pozorován významný rozdíl. Tento výsledek pravděpodobně souvisí s odlišnými parametry buněčného transportu těchto derivátů, díky kterým jsou nové deriváty taxanů lépe transportovány do buněk než paclitaxel a jejich zpětný tok je nižší (Ehrlichova *et al.* 2005). Kromě toho SB-T deriváty mají vyšší afinitu k mikrotubulům a způsobují jejich rychlejší polymerizaci než konvenční taxany (Ojima *et al.* 2018). SB-T deriváty taxanů jsou na pracovišti Oddělení Toxikogenomiky díky spolupráci s americkým pracovištěm (Institute of Chemical Biology and Drug Discovery, State University of New York at Stony Brook, USA) studovány již několik let. Celá řada derivátů včetně taxanů II. generace, které díky svým modifikacím na C-3' postranním řetězci paclitaxelu prokázala svou účinnost *in vitro* v rezistentních nádorových buňkách karcinomu prsu či ve vysoce rezistentních buňkách NCI/ADR-RES karcinomu ovaria (Zheng *et al.* 2017; Němcová-Fürstová *et al.* 2016; Ojima *et al.* 2016; Ehrlichová *et al.* 2012; Kovář *et al.* 2009; Vobořilová *et al.* 2009; Ehrlichová *et al.* 2005a; Ehrlichova *et al.* 2005b; Gut *et al.* 2006). Rovněž *in vivo* již některé deriváty ukázaly účinek na CDX (Cell line derivated xenografts) myších modelech karcinomu pankreatu (Oliverius *et al.* 2019; Mohelnikova-Duchonova *et al.* 2017) či potkaních modelech lymfomů (Otová *et al.* 2012). V případě taxanů II. generace ovšem byla během jejich *in vivo* aplikace pozorována v závislosti na použité koncentraci i značná toxicita těchto derivátů na studovaných modelech. Podléhají stejně jako paclitaxel biotransformacím za účasti CYP3A4 na neúčinné metabolity (Ojima *et al.*

2018). Proto jsou vyvíjeny další SB-T deriváty tzv. III. generace, u kterých by jednak měla být zlepšena rozpustnost a nepodléhaly by tak snadno metabolické deaktivaci díky modifikacím ve struktuře (Ojima *et al.* 2018). V této diplomové práci byla poprvé porovnávána a měřena účinnost ve SKOV3 typu ovariální buněčné linie a taxanů III. generace. Jejich účinek na rezistentní linie karcinomu ovaria je shodný s taxany II. generace a především výrazně vyšší v porovnání s paclitaxelem a mohou tak být studovány v další *in vivo* fázi výzkumu kandidátních látek pro terapii rezistentních nádorů.

### **6.2.2 Studie genové exprese ABCC3, CPS1, TRIP6 v buněčných liniích karcinomu ovaria**

V další části diplomové práce byly stanoveny hladiny transkriptů *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* v senzitivních SKOV3/S a vůči paclitaxelu rezistentních SKOV3/PCT-RES (SKOV3/R) liniích karcinomu ovaria s cílem zjistit případné rozdíly v genové expresi mezi buňkami s rozdílnou citlivostí na taxany. Zatímco exprese genů *TRIP6* a *ABCC3* se ve třech nezávislých experimentech mezi sledovanými liniemi nelišila, exprese *CPS1* genu byla významně vyšší v rezistentní linii ovariálního karcinomu, což odpovídá výsledkům získaným v klinické části studie se vzorky pacientek s karcinomem ovaria. Vyšší hladiny *CPS1* mRNA v rezistentních buňkách karcinomu ovaria podporují nalezený vztah vyšší exprese a kratšího bezpříznakového přežívání pacientek. U rezistentního typu buněk tedy nejspíše dochází k upregulaci genové exprese *CPS1*, přičemž zvýšená aktivita enzymu *CPS1* významně ovlivňuje metabolismus nádorových buněk, detoxikaci amoniaku a syntézu pyrimidinu (Garcia-Bermudez *et al.* 2020; Muhammad a Kim 2020; Nitzahn a Lipshutz 2020; Lie *et al.* 2019; Diez-Fernandez *et al.* 2013; Funghini *et al.* 2012). Všechny tyto faktory mohou vést ke zvýšené proliferaci zejména rezistentních buněk, kde je exprese *CPS1* navýšena.

Nalezená deregulace genové exprese *CPS1* byla natolik významná, že bylo dále studováno její ovlivnění po aplikaci paclitaxelu a syntetických SB-T derivátů (SB-T-1216, SB-T-121602, SB-T-121605 a SB-T-121606). Právě tyto nové SB-T deriváty mají významně vyšší účinnost v rezistentních buňkách, jak bylo v diplomové práci potvrzeno stanovením hodnot  $IC_{50}$ . Vliv aplikace taxanů na expresi *CPS1* genu byl sledován v senzitivních i v rezistentních buňkách karcinomu prsu a byly nalezeny významné změny exprese tohoto genu v obou typech linií, které potvrzují přímou souvislost mezi aplikací taxanů a změnou exprese *CPS1*.

V rámci senzitivní buněčné linie ovariálního karcinomu byla nalezena významně snížená exprese *CPSI* po aplikaci paclitaxelu, SB-T-121602 a SB-T-121605. Naopak aplikace SB-T-1216 a SB-T-121606 derivátů vedla ke zvýšení exprese *CPSI*. U rezistentní buněčné linie ovariálního karcinomu byla zaznamenán signifikantně velmi snížená exprese *CPSI* ve vzorcích ošetřených SB-T-121602 a SB-T-121605 a také 5 nM SB-T-121606. Pouze vyšší koncentrace SB-T-121606 (10 nM) naopak expresi *CPSI* zvyšovala. Ovlivnění genové exprese aplikací taxanů se tedy významně odvíjí jak od typu nádorových buněk a tkáně, tak od struktury použitých taxanů. Nové deriváty taxanů jsou na základě strukturně-aktivitních vztahů vyvíjeny s cílem získat účinné preparáty v rezistentních nádorových buňkách (*Oliverius et al. 2019; Němcová-Fürstová et al. 2016; Kovář et al. 2009; Vobořilová et al. 2009; Ehrlichová et al. 2005; Ehrlichová et al. 2005*). Jak ukazují získaná data, opravdu je jejich účinnost vyšší než u paclitaxelu, přičemž z hlediska ovlivnění exprese *CPSI* se zdá být podstatná substituce na C-2 postranním řetězci taxanového derivátu. V případě přítomnosti methylové skupiny či  $-OCF_3$  v C-2 postranním řetězci taxanového derivátu dochází aplikací ke snížení exprese *CPSI*. Pokud není v této pozici substituce, či je přítomna  $-OCF_2H$  substituce, dochází naopak k navýšení exprese genu *CPSI*. Doposud byly vzhledem k možnostem překonání rezistence vůči paclitaxelu u nových taxanových derivátů nalezeny jako významné substituenty v pozicích C-3' postranního řetězce (*Jelínek et al. 2018*) a další substituce jsou v současnosti detailně sledovány. Výsledky v této diplomové práci naznačují význam substitucí v polohách C-2 řetězce taxanové struktury. Na závěr této části studie v diplomové práci lze shrnout, že klasické taxany využívané v chemoterapii i jejich potenciálně použitelné nové syntetické SB-T deriváty v závislosti na jejich struktuře pravděpodobně tedy velmi významně ovlivňují expresi jednoho z kandidátních genů *CPSI* s potenciální úlohou v rezistenci a účinnosti léčby karcinomu ovaria.

## 7 Souhrn

Náplní předkládané diplomové práce bylo studium genového expresního profilu *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* v kohortách pacientek s karcinomem ovaria a prsu s cílem nalezení vztahu mezi mírou exprese studovaných genů a prognózou, progresí a léčebnou odpovědí pacientek. Zároveň byla provedena *in vitro* studie porovnávací účinnosti konvenčního taxanu paclitaxelu a nových SB-T taxanových derivátů v senzitivních a paclitaxel-rezistentních nádorových liniích karcinomu ovaria. V obou typech linií byly také hledány možné rozdíly expresního profilu kandidátních genů *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* a hledány případné deregulace genové exprese způsobené aplikací taxanů.

V první části studie bylo provedeno stanovení genového expresního profilu kandidátních biomarkerů (*ABCC3*, *CPS1*, *TRIP6*) ve vzorcích karcinomu ovaria a prsu. Všechny tři geny byly exprimovány nad limitem detekce. Dále byly porovnávány rozdíly v expresi mezi prsní a ovariální nádorovou tkání. Zatímco v ovariální nádorové tkáni byl nejvíce exprimován gen *TRIP6* následovaný geny *ABCC3* a *CPS1*, u karcinomů prsu tomu bylo naopak a nejvyšší byly hladiny *CPS1* genu následované *ABCC3* a *TRIP6* genem. Při porovnání nádorové a nenádorové ovariální tkáně, která byla k dispozici, byla nalezena významně snížená exprese genů *CPS1* a *TRIP6* a naopak významně zvýšená exprese genu *ABCC3* v nádorové tkáni oproti nenádorové tkáni. V případě genu *ABCC3* se u vzorků po léčbě hladina exprese snížila na stejnou úroveň jako v nenádorové ovariální tkáni. Následně byly analyzovány vztahy mezi expresí jednotlivých genů a klinicko-patologickými charakteristikami pacientek obou sledovaných kohort.

V rámci tohoto posuzování byl nalezen především významný vztah mezi vyššími hladinami exprese genu *CPS1* a kratší dobou bezpříznakového přežívání u pacientek s karcinomem ovaria. U pacientek s karcinomem prsu je naznačena asociace delšího celkového přežívání s vyšší expresí *ABCC3*, jejíž případná signifikance ale musí být ověřena. Z této části studie vyplývá, že gen *CPS1* související s přežíváním pacientek s karcinomem ovaria je vhodným kandidátem jako molekulární biomarker pro detailní studium jeho funkce v ovariálních buňkách a potenciální využití v cílené protinádorové léčbě.

V této diplomové práci byla také úspěšně zavedena metodika pro stanovení exprese miRNA pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase. Byl zaveden postup reverzní transkripce konkrétních miRNA a referenční malé jaderné U6-snRNA. Jako testovací byla vybrána miRNA-665, která cílí na gen *ABCC3*. Úspěšně se podařilo zavést metodu stanovení exprese miRNA-665 a referenční U6-snRNA s využitím specifických TaqMan miRNA Expression esejí. V pilotním setu 30 vzorků nádorové a 3 vzorků nenádorové tkáně byla exprese miRNA-665 významně vyšší v nádorové tkáni prsu, což je v souladu s potencionální negativní regulací exprese *ABCC3*, která byla u těchto vzorků snížena. Získané hladiny exprese miRNA-665 byly posuzovány spolu s klinicko-patologickými daty pacientek, avšak v rámci této analýzy nebyl identifikován žádný významný vztah.

Druhá část diplomové práce se zabývala *in vitro* ověřením účinnosti taxanů II. (SB-T-1216) a III. generace (SB-T-121602, SB-T-121605, SB-T-121606) v porovnání s paclitaxelem na senzitivních a rezistentních buněčných liniích ovariálního karcinomu SKOV3. Účinnost byla stanovena na základě hodnot  $IC_{50}$  a bylo zjištěno, že SB-T taxanové deriváty jsou mnohonásobně (až 423x) účinnější v rezistentních nádorových buňkách karcinomu ovaria než paclitaxel. Na základě těchto výsledků byly vybrány taxanové deriváty pro další fáze jejich preklinického *in vivo* výzkumu jako potenciálních preparátů účinných na rezistentní formy nádorů.

Při studiu rozdílů v expresi sledovaných genů *ABCC3*, *CPS1* a *TRIP6* *in vitro* mezi senzitivními a rezistentními buňkami karcinomu ovaria byla nalezena významně vyšší hladina *CPS1* genu v rezistentních ovariálních buňkách. U tohoto genu bylo dále sledováno, zda je jeho exprese ovlivněna následnou aplikací paclitaxelu a taxanových SB-T derivátů (SB-T-1216, SB-T-121602, SB-T-121605, SB-T-121606) v obou typech linií. V tomto případě bylo zjištěno, že jak paclitaxel, tak nové syntetické SB-T deriváty v závislosti na jejich struktuře významně ovlivňují expresi kandidátního molekulárního biomarkeru *CPS1* s potenciální úlohou v účinnosti taxanové léčby karcinomu ovaria.

## 8 Seznam použité literatury

Abrahámová, Jitka, 2019. *Co byste měli vědět o rakovině prsu 2*. 2. Praha: Grada. ISBN 978-80-271-2055-0.

Adamska, Aleksandra, Alice Domenichini, Emily Capone, Verena Damiani, Begum Gokcen Akkaya, Kenneth J. LINTON, Pierluigi DI Sebastiano, Xi Chen, Adam B. Keeton, Veronica Ramirez-Alcantara, Yulia Maxuitenko, Gary A. Piazza, Vincenzo De Laurenzi, Gianluca Sala a Marco Falasca, 2019. Pharmacological inhibition of ABCC3 slows tumour progression in animal models of pancreatic cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* [online]. **38**(1), 312. ISSN 1756-9966. Dostupné z: doi:10.1186/s13046-019-1308-7

Albagoush, Sara A. a Faten Limaiem, 2021. HER2. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [vid. 2021-07-30]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537134/>

Ali Syeda, Zainab, Siu Semar Saratu' Langden, Choijamts Munkhzul, Mihye Lee a Su Jung Song, 2020. Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **21**(5), 1723. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21051723

Amin, Noa, Narda Chaabouni a Angela George, 2020. Genetic testing for epithelial ovarian cancer. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* [online]. **65**, Advances in Screening and Prevention of Women's Cancers, 125–138. ISSN 1521-6934. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpobgyn.2020.01.005

Arend, Rebecca C., Angelina I. Londoño, Allison M. Montgomery, Haller J. Smith, Zachary C. Dobbin, Ashwini A. Katre, Alba Martinez, Eddy S. Yang, Ronald D. Alvarez, Warner K. Huh, Kerri S. Bevis, J. Michael Straughn, Jacob M. Estes, Lea Novak, David K. Crossman, Sara J. Cooper, Charles N. Landen a Charles A. Leath, 2018. Molecular Response to Neoadjuvant Chemotherapy in High-Grade Serous Ovarian Carcinoma. *Molecular cancer research: MCR* [online]. **16**(5), 813–824. ISSN 1557-3125. Dostupné z: doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0594

As, Oguntade, Al-Amodi F, Alrumayh A, Alobaida M a Bwalya M, 2021. Anti-angiogenesis in cancer therapeutics: the magic bullet. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute* [online]. **33**(1) [vid. 2021-07-22]. ISSN 2589-0409. Dostupné z: doi:10.1186/s43046-021-00072-6

Auner, Veronika, Jalid Sehouli, Gülten Oskay-Oezcelik, Reinhard Horvat, Paul Speiser a Robert Zeillinger, 2010. ABC transporter gene expression in benign and malignant ovarian tissue. *Gynecologic Oncology* [online]. **117**(2), 198–201. ISSN 1095-6859. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygyno.2009.10.077

Balaji, Sai A., Nayanabhirama Udupa, Mallikarjuna Rao Chamallamudi, Vijayanti Gupta a Annapoorni Rangarajan, 2016. Role of the Drug Transporter ABCC3 in Breast Cancer Chemoresistance. *PLoS ONE* [online]. **11**(5), e0155013. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0155013

Bartsch, Rupert, 2021. SABCS 2020: update on triple-negative and metastatic HER2-positive breast cancer. *Memo* [online]. 1–5. ISSN 1865-5041. Dostupné z: doi:10.1007/s12254-021-00722-4

Baudino, Troy A., 2015. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Current Drug Discovery Technologies* [online]. **12**(1), 3–20. ISSN 1875-6220. Dostupné z: doi:10.2174/1570163812666150602144310

- Benjamini, Yoav a Yosef Hochberg, 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*. **57**(1), 289–300. ISSN 0035-9246.
- Berek, Jonathan S., Sean T. Kehoe, Lalit Kumar a Michael Friedlander, 2018. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* [online]. **143**(S2), 59–78. ISSN 1879-3479. Dostupné z: doi:10.1002/ijgo.12614
- Bertolaso, Marta a Anna Maria Dieli, 2017. Cancer and intercellular cooperation. *Royal Society Open Science* [online]. **4**(10), 170470. ISSN 2054-5703. Dostupné z: doi:10.1098/rsos.170470
- Biller, Leah H., Sapna Syngal a Matthew B. Yurgelun, 2019. Recent advances in Lynch syndrome. *Familial Cancer* [online]. **18**(2), 211–219. ISSN 1573-7292. Dostupné z: doi:10.1007/s10689-018-00117-1
- Bruhn, Oliver a Ingolf Cascorbi, 2014. Polymorphisms of the drug transporters ABCB1, ABCG2, ABCC2 and ABCC3 and their impact on drug bioavailability and clinical relevance. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* [online]. **10**(10), 1337–1354. ISSN 1742-5255. Dostupné z: doi:10.1517/17425255.2014.952630
- Bukowski, Karol, Mateusz Kciuk a Renata Kontek, 2020. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **21**(9), 3233. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21093233
- Calota, Firmilian, Cristian Mesina, Stelian Mogoanta a Dragos Calota, 2019. Oncogenesis-kaleidoscopic and multi-level reality. *Journal of Mind and Medical Sciences* [online]. 31–40. ISSN 23927674. Dostupné z: doi:10.22543/7674.61.P3140
- Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address: wheeler@bcm.edu a Cancer Genome Atlas Research Network, 2017. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell* [online]. **169**(7), 1327-1341.e23. ISSN 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2017.05.046
- Cardoso, F., S. Paluch-Shimon, E. Senkus, G. Curigliano, M. S. Aapro, F. André, C. H. Barrios, J. Bergh, G. S. Bhattacharyya, L. Biganzoli, F. Boyle, M.-J. Cardoso, L. A. Carey, J. Cortés, N. S. El Saghir, M. Elzayat, A. Eniu, L. Fallowfield, P. A. Francis, K. Gelmon, J. Gligorov, R. Haidinger, N. Harbeck, X. Hu, B. Kaufman, R. Kaur, B. E. Kiely, S.-B. Kim, N. U. Lin, S. A. Mertz, S. Neciosup, B. V. Offersen, S. Ohno, O. Pagani, A. Prat, F. Penault-Llorca, H. S. Rugo, G. W. Sledge, C. Thomssen, D. A. Vorobiof, T. Wiseman, B. Xu, L. Norton, A. Costa a E. P. Winer, 2020. 5th ESO-ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 5). *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* [online]. **31**(12), 1623–1649. ISSN 1569-8041. Dostupné z: doi:10.1016/j.annonc.2020.09.010
- Casey, M.C., A. Prakash, E. Holian, A. McGuire, O. Kalinina, A. Shalaby, C. Curran, M. Webber, G. Callagy, E. Bourke, M. J. Kerin a J. A. Brown, 2019. Quantifying Argonaute 2 (Ago2) expression to stratify breast cancer. *BMC Cancer* [online]. **19**(1), 712. ISSN 1471-2407. Dostupné z: doi:10.1186/s12885-019-5884-x
- Caulfield, Sarah E., Christine C. Davis a Kristina F. Byers, 2019. Olaparib: A Novel Therapy for Metastatic Breast Cancer in Patients With a BRCA1/2 Mutation. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology*. **10**(2), 167–174. ISSN 2150-0878.



Colombo, N., J. A. Ledermann, a ESMO Guidelines Committee, 2021. Updated treatment recommendations for newly diagnosed epithelial ovarian carcinoma from the ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* [online]. S0923-7534(21)02182-7. ISSN 1569-8041. Dostupné z: doi:10.1016/j.annonc.2021.07.004

Cui, Shi-Yun, Rui Wang a Long-Bang Chen, 2013. MicroRNAs: key players of taxane resistance and their therapeutic potential in human cancers. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [online]. 17(10), 1207–1217. ISSN 1582-1838. Dostupné z: doi:10.1111/jcmm.12131

Dalmaso, Guillaume, Hang Thi Thu Nguyen, Yutao Yan, Hamed Laroui, Moiz A. Charania, Saravanan Ayyadurai, Shanthi V. Sitaraman a Didier Merlin, 2011. Microbiota modulate host gene expression via microRNAs. *PloS One* [online]. 6(4), e19293. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0019293

Daniel, Petr, Petr Halada, Michael Jelínek, Kamila Balušíková a Jan Kovář, 2019. Differentially Expressed Mitochondrial Proteins in Human MCF7 Breast Cancer Cells Resistant to Paclitaxel. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 20(12), E2986. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20122986

De Cima, Sergio, Luis M. Polo, Carmen Díez-Fernández, Ana I. Martínez, Javier Cervera, Ignacio Fita a Vicente Rubio, 2015. Structure of human carbamoyl phosphate synthetase: deciphering the on/off switch of human ureagenesis. *Scientific Reports* [online]. 5(1), 16950. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep16950

Didychuk, Allison L., Samuel E. Butcher a David A. Brow, 2018. The life of U6 small nuclear RNA, from cradle to grave. *RNA (New York, N.Y.)* [online]. 24(4), 437–460. ISSN 1469-9001. Dostupné z: doi:10.1261/rna.065136.117

Díez-Fernandez, Carmen a Johannes Häberle, 2017. Targeting CPS1 in the treatment of Carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1) deficiency, a urea cycle disorder. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* [online]. 21(4), 391–399. ISSN 1744-7631. Dostupné z: doi:10.1080/14728222.2017.1294685

Díez-Fernandez, Carmen, Ana I. Martínez, Satu Pekkala, Belén Barcelona, Isabel Pérez-Arellano, Ana María Guadalajara, Marshall Summar, Javier Cervera a Vicente Rubio, 2013. Molecular characterization of carbamoyl-phosphate synthetase (CPS1) deficiency using human recombinant CPS1 as a key tool. *Human Mutation* [online]. 34(8), 1149–1159. ISSN 1098-1004. Dostupné z: doi:10.1002/humu.22349

Dochez, Vincent, Hélène Caillon, Edouard Vaucel, Jérôme Dimet, Norbert Winer a Guillaume Ducarme, 2019. Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review. *Journal of Ovarian Research* [online]. 12, 28. ISSN 1757-2215. Dostupné z: doi:10.1186/s13048-019-0503-7

Drăgănescu, Mădălina a Codruța Carmocan, 2017. Hormone Therapy in Breast Cancer. *Chirurgia (Bucharest, Romania: 1990)* [online]. 112(4), 413–417. ISSN 1221-9118. Dostupné z: doi:10.21614/chirurgia.112.4.413

Dugger, Sarah A., Adam Platt a David B. Goldstein, 2018. Drug development in the era of precision medicine. *Nature Reviews. Drug Discovery* [online]. 17(3), 183–196. ISSN 1474-1784. Dostupné z: doi:10.1038/nrd.2017.226

Ehrlichová, Marie, Michal Koc, Jaroslav Truksa, Zuzana Nadova, Radka Vaclavikova a Jan Kovár, 2005. Ehrlichova M, Koc M, Truksa J, Naldova Z, Vaclavikova R, Kovar J. Cell death induced by taxanes in breast cancer cells: cytochrome c is released in resistant but not in sensitive cells. *Anticancer Res* 25: 4215-4224. *Anticancer research*. **25**, 4215–24.

Ehrlichová, Marie, Iwao Ojima, Jin Chen, Radka Vaclavikova, Vlasta Nemcova, Jana Vobořilová, Petr Simek, Stanislav Horský, Pavel Soucek, Jan Kovář, Marek Brabec a Ivan Gut, 2012. Transport, metabolism, cytotoxicity and effects of novel taxanes on the cell cycle in MDA-MB-435 and NCI/ADR-RES cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* [online]. **385**, 1035–48. Dostupné z: doi:10.1007/s00210-012-0785-4

Ehrlichova, Marie, Radka Vaclavikova, Iwao Ojima, Antonella Pepe, Larisa Kuznetsova, Jin Chen, Jaroslav Truksa, Jan Kovar a Ivan Gut, 2005. Transport and cytotoxicity of paclitaxel, docetaxel, and novel taxanes in human breast cancer cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* [online]. **372**, 95–105. Dostupné z: doi:10.1007/s00210-005-1080-4

Elsnerova, Katerina, Beatrice Mohelnikova-Duchonova, Ela Cerovska, Marie Ehrlichova, Ivan Gut, Lukas Rob, Petr Skapa, Martin Hruda, Alena Bartakova, Jiri Bouda, Pavel Vodicka, Pavel Soucek a Radka Vaclavikova, 2016. Gene expression of membrane transporters: Importance for prognosis and progression of ovarian carcinoma. *Oncology Reports* [online]. **35**(4), 2159–2170. ISSN 1791-2431. Dostupné z: doi:10.3892/or.2016.4599

Fagerberg, Linn, Björn M. Hallström, Per Oksvold, Caroline Kampf, Dijana Djureinovic, Jacob Odeberg, Masato Habuka, Simin Tahmasebpour, Angelika Danielsson, Karolina Edlund, Anna Asplund, Evelina Sjöstedt, Emma Lundberg, Cristina Al-Khalili Szigartyo, Marie Skogs, Jenny Ottosson Takanen, Holger Berling, Hanna Tegel, Jan Mulder, Peter Nilsson, Jochen M. Schwenk, Cecilia Lindskog, Frida Danielsson, Adil Mardinoglu, Åsa Sivertsson, Kalle Von Feilitzen, Mattias Forsberg, Martin Zwahlen, IngMarie Olsson, Sanjay Navani, Mikael Huss, Jens Nielsen, Fredrik Ponten a Mathias Uhlén, 2014. Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* [online]. **13**(2), 397–406. ISSN 1535-9476. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M113.035600

Fang, Xuqian, Xiaoqiong Wu, Enfei Xiang, Fangxiu Luo, Qinqin Li, Qianchen Ma, Fei Yuan a Peizhan Chen, 2021. Expression profiling of CPS1 in Correa's cascade and its association with gastric cancer prognosis. *Oncology Letters* [online]. **21**(6), 441. ISSN 1792-1074. Dostupné z: doi:10.3892/ol.2021.12702

Ferlini, Cristiano, Lucia Cicchillitti, Giuseppina Raspaglio, Silvia Bartollino, Samanta Cimitan, Carlo Bertucci, Simona Mozzetti, Daniela Gallo, Marco Persico, Caterina Fattorusso, Giuseppe Campiani a Giovanni Scambia, 2009. Paclitaxel Directly Binds to Bcl-2 and Functionally Mimics Activity of Nur77. *Cancer Research* [online]. **69**(17), 6906–6914. ISSN 0008-5472, 1538-7445. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0540

Flaum, Nicola, Emma J. Crosbie, Richard J. Edmondson, Miriam J. Smith a Dafydd G. Evans, 2020. Epithelial ovarian cancer risk: A review of the current genetic landscape. *Clinical Genetics* [online]. **97**(1), 54–63. ISSN 1399-0004. Dostupné z: doi:10.1111/cge.13566

Fouad, Yousef Ahmed a Carmen Aanei, 2017. Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Cancer Research*. **7**(5), 1016–1036. ISSN 2156-6976.

Funghini, S., J. Thusberg, M. Spada, S. Gasperini, R. Parini, L. Ventura, C. Meli, L. De Cosmo, M. Sibilio, S. D. Mooney, R. Guerrini, M. A. Donati a A. Morrone, 2012. Carbamoyl phosphate synthetase 1 deficiency in Italy: clinical and genetic findings in a heterogeneous cohort. *Gene* [online]. **493**(2), 228–234. ISSN 1879-0038. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2011.11.052

Gaona-Luviano, Patricia, Lourdes Adriana Medina-Gaona a Cassandra Magaña-Pérez, 2020. Epidemiology of ovarian cancer. *Chinese Clinical Oncology* [online]. **9**(4), 47–47. ISSN 2304-3873, 2304-3865. Dostupné z: doi:10.21037/cco-20-34

Garcia-Bermudez, Javier, Robert T. Williams, Rohiverth Guarecuco a Kıvanç Birsoy, 2020. Targeting extracellular nutrient dependencies of cancer cells. *Molecular Metabolism* [online]. **33**, Cancer Metabolism, 67–82. ISSN 2212-8778. Dostupné z: doi:10.1016/j.molmet.2019.11.011

Gargallo, P., Y. Yáñez, V. Segura, A. Juan, B. Torres, J. Balaguer, S. Oltra, V. Castel a A. Cañete, 2020. Li–Fraumeni syndrome heterogeneity. *Clinical and Translational Oncology* [online]. **22**(7), 978–988. ISSN 1699-3055. Dostupné z: doi:10.1007/s12094-019-02236-2

Gärtner, Jan, Berndt Alt-Epping a Marion Daun, 2018. [Palliative Care - not just for the final phase. A review of evidence]. *Therapeutische Umschau. Revue Therapeutique* [online]. **75**(2), 123–126. ISSN 0040-5930. Dostupné z: doi:10.1024/0040-5930/a000977

Gebert, Luca F. R. a Ian J. MacRae, 2019. Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. **20**(1), 21–37. ISSN 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/s41580-018-0045-7

Goodson, Holly V. a Erin M. Jonasson, 2018. Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. **10**(6), a022608. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a022608

Grunewald, Thomas G. P., Semjon Willier, Dirk Janik, Rebekka Unland, Cora Reiss, Olivia Prazeres da Costa, Thorsten Buch, Uta Dirksen, Günther H. S. Richter, Frauke Neff, Stefan Burdach a Elke Butt, 2013. The Zyxin-related protein thyroid receptor interacting protein 6 (TRIP6) is overexpressed in Ewing's sarcoma and promotes migration, invasion and cell growth. *Biology of the Cell* [online]. **105**(11), 535–547. ISSN 1768-322X. Dostupné z: doi:10.1111/boc.201300041

Gut, I., I. Ojima, R. Vaclavikova, P. Simek, S. Horsky, I. Linhart, P. Soucek, E. Kondrova, L. V. Kuznetsova a J. Chen, 2006. Metabolism of new-generation taxanes in human, pig, minipig and rat liver microsomes. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* [online]. **36**(9), 772–792. ISSN 0049-8254. Dostupné z: doi:10.1080/00498250600829220

Hanahan, Douglas a Robert A. Weinberg, 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* [online]. **100**(1), 57–70. ISSN 0092-8674, 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9

Hanahan, Douglas a Robert A. Weinberg, 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [online]. **144**(5), 646–674. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

Hayes, Josie, Pier Paolo Peruzzi a Sean Lawler, 2014. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends in Molecular Medicine* [online]. **20**(8), 460–469. ISSN 1471-4914, 1471-499X. Dostupné z: doi:10.1016/j.molmed.2014.06.005

He, Qiyi, Zhentian Yan, Fengling Si, Yong Zhou, Wenbo Fu a Bin Chen, 2019. ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Genes Involved in Pyrethroid Resistance in the Malaria Vector *Anopheles sinensis*: Genome-Wide Identification, Characteristics, Phylogenetics, and Expression Profile. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **20**(6), 1409. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20061409

Hlaváč, Viktor, Veronika Brynychová, Radka Václavíková, Marie Ehrlichová, David Vrána, Václav Pecha, Renata Koževnikovová, Markéta Trnková, Jiří Gatěk, Dana Kopperová, Ivan Gut a Pavel Souček, 2013. The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast

carcinoma. *Pharmacogenomics* [online]. **14**(5), 515–529. ISSN 1744-8042. Dostupné z: doi:10.2217/pgs.13.26

Hlaváč, Viktor, Radka Václavíková, Veronika Brynychová, Renata Koževnikovová, Katerina Kopečková, David Vrána, Jiří Gatěk a Pavel Souček, 2020. Role of Genetic Variation in ABC Transporters in Breast Cancer Prognosis and Therapy Response. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **21**(24) [vid. 2021-03-21]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21249556

Holohan, Caitriona, Sandra Van Schaeybroeck, Daniel B. Longley a Patrick G. Johnston, 2013. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews. Cancer* [online]. **13**(10), 714–726. ISSN 1474-1768. Dostupné z: doi:10.1038/nrc3599

Hu, Jianghong, Guohua Ni, Ling Mao, Xianglong Xue, Jijie Zhang, Weixia Wu, Shaoru Zhang, Hong Zhao, Lifang Ding a Lihui Wang, 2019. LINC00565 promotes proliferation and inhibits apoptosis of gastric cancer by targeting miR-665/AKT3 axis. *OncoTargets and Therapy* [online]. **12**, 7865–7875. ISSN 1178-6930. Dostupné z: doi:10.2147/OTT.S189471

Hubackova, Miluse, Radka Vaclavikova, Marie Ehrlichova, Marcela Mrhalova, Roman Kodet, Katerina Kubackova, David Vrána, Ivan Gut a Pavel Soucek, 2012. Association of superoxide dismutases and NAD(P)H quinone oxidoreductases with prognosis of patients with breast carcinomas. *International Journal of Cancer* [online]. **130**(2), 338–348. ISSN 1097-0215. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.26006

Chatterjee, Nilanjana a Trever G. Bivona, 2019. Polytherapy and Targeted Cancer Drug Resistance. *Trends in cancer* [online]. **5**(3), 170–182. ISSN 2405-8033. Dostupné z: doi:10.1016/j.trecan.2019.02.003

Chen, Yuhao a Xiaowei Wang, 2020. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Research* [online]. **48**(D1), D127–D131. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkz757

Chien, Jeremy a Elizabeth M. Poole, 2017. Ovarian Cancer Prevention, Screening, and Early Detection: Report From the 11th Biennial Ovarian Cancer Research Symposium. *International Journal of Gynecologic Cancer* [online]. **27**(S5) [vid. 2021-07-09]. ISSN 1048-891X, 1525-1438. Dostupné z: doi:10.1097/IGC.0000000000001118

Chu, Edward a Vincent T DeVita, 2021. *Physicians' cancer chemotherapy drug manual 2020* [online] [vid. 2021-07-10]. ISBN 978-1-284-19805-8. Dostupné z: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=2294403>

Ishikawa, Takashi, Yasushi Ichikawa, Daisuke Shimizu, Takeshi Sasaki, Mikiko Tanabe, Takashi Chishima, Kazuaki Takabe a Itaru Endo, 2014. The role of HER-2 in Breast Cancer. *Journal of surgery and science*. **2**(1), 4–9. ISSN 2333-4703.

Jansson, Martin D. a Anders H. Lund, 2012. MicroRNA and cancer. *Molecular Oncology* [online]. **6**(6), 590–610. ISSN 1574-7891. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.09.006

Januškevičienė, Indrė a Vilma Petrikaitė, 2019. Heterogeneity of breast cancer: The importance of interaction between different tumor cell populations. *Life Sciences* [online]. **239**, 117009. ISSN 0024-3205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2019.117009

Jelínek, Michael, Kamila Balušíková, Petr Daniel, Vlasta Němcová-Fürstová, Palani Kirubakaran, Martin Jaček, Longfei Wei, Xin Wang, Jiří Vondrášek, Iwao Ojima a Jan Kovář, 2018. Substituents at the C3' and C3''N positions are critical for taxanes to overcome acquired resistance of cancer cells to paclitaxel. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. **347**, 79–91. ISSN 1096-0333. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2018.04.002

Ji, Xiwei, Yuan Lu, Huifang Tian, Xiangrui Meng, Minji Wei a William C. Cho, 2019. Chemoresistance mechanisms of breast cancer and their countermeasures. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. **114**, 108800. ISSN 0753-3322. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2019.108800

Kaye, Stanley B., 2008. Management of partially platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *European Journal of Cancer Supplements* [online]. **6(4)**, Breast Cancer and Ovarian Cancer: State of the Art Treatment Approaches, 16–21. ISSN 1359-6349. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejcsup.2007.12.003

Kenna, J. Gerry, Kunal S. Taskar, Christina Battista, David L. Bourdet, Kim L. R. Brouwer, Kenneth R. Brouwer, David Dai, Christoph Funk, Michael J. Hafey, Yurong Lai, Jonathan Maher, Y. Anne Pak, Jenny M. Pedersen, Joseph W. Polli, A. David Rodrigues, Paul B. Watkins, Kyunghye Yang a Robert W. Yucha, 2018. Can Bile Salt Export Pump Inhibition Testing in Drug Discovery and Development Reduce Liver Injury Risk? An International Transporter Consortium Perspective. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* [online]. **104(5)**, 916–932. ISSN 1532-6535. Dostupné z: doi:10.1002/cpt.1222

Kim, Bo-Hyung, Heung-Kwon Oh, Duck-Woo Kim, Sung-Bum Kang, Younghee Choi a Eun Shin, 2020. Clinical Implications of Cancer Stem Cell Markers and ABC Transporters as a Predictor of Prognosis in Colorectal Cancer Patients. *Anticancer Research* [online]. **40(8)**, 4481–4489. ISSN 1791-7530. Dostupné z: doi:10.21873/anticancer.14453

Klener, Pavel, 2011. *Základy klinické onkologie*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-716-5.

Klener, Pavel a Pavel Klener jr., 2013. *Principy systémové protinádorové léčby*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-4171-0.

Kobayashi, Minoru, Ryo Funayama, Shinobu Ohnuma, Michiaki Unno a Keiko Nakayama, 2016. Wnt- $\beta$ -catenin signaling regulates ABCC3 (MRP3) transporter expression in colorectal cancer. *Cancer Science* [online]. **107(12)**, 1776–1784. ISSN 1349-7006. Dostupné z: doi:10.1111/cas.13097

Kovář, Jan, Marie Ehrlichová, Barbora Šmejkalová, Ilaria Zanardi, Iwao Ojima a Ivan Gut, 2009. Comparison of Cell Death-inducing Effect of Novel Taxane SB-T-1216 and Paclitaxel in Breast Cancer Cells. *Anticancer research*. **29(8)**, 2951–2960. ISSN 0250-7005.

Kuchenbaecker, Karoline B., John L. Hopper, Daniel R. Barnes, Kelly-Anne Phillips, Thea M. Mooij, Marie-José Roos-Blom, Sarah Jervis, Flora E. Van Leeuwen, Roger L. Milne, Nadine Andrieu, David E. Goldgar, Mary Beth Terry, Matti A. Rookus, Douglas F. Easton, Antonis C. Antoniou, BRCA1 and BRCA2 Cohort Consortium, Lesley McGuffog, D. Gareth Evans, Daniel Barrowdale, Debra Frost, Julian Adlard, Kai-Ren Ong, Louise Izatt, Marc Tischkowitz, Ros Eeles, Rosemarie Davidson, Shirley Hodgson, Steve Ellis, Catherine Nogues, Christine Lasset, Dominique Stoppa-Lyonnet, Jean-Pierre Fricker, Laurence Faivre, Pascaline Berthet, Maartje J. Hoening, Lizet E. Van der Kolk, Carolien M. Kets, Muriel A. Adank, Esther M. John, Wendy K. Chung, Irene L. Andrulis, Melissa Southey, Mary B. Daly, Sandra S. Buys, Ana Osorio, Christoph Engel, Karin Kast, Rita K. Schmutzler, Trinidad Caldes, Anna Jakubowska, Jacques Simard, Michael L. Friedlander, Sue-Anne McLachlan, Eva Machackova, Lenka Foretova, Yen Y. Tan, Christian F. Singer, Edith Olah, Anne-Marie Gerdes, Brita Arver a Håkan Olsson, 2017.

Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA* [online]. **317**(23), 2402–2416. ISSN 1538-3598. Dostupné z: doi:10.1001/jama.2017.7112

Kumar, Manoj, Ravinder Nagpal, R. Hemalatha, Vinod Verma, Ashok Kumar, Satvinder Singh, Francesco Marotta, Shalini Jain a Hariom Yadav, 2012. Targeted cancer therapies: the future of cancer treatment. *Acta Bio-Medica: Atenei Parmensis*. **83**(3), 220–233. ISSN 0392-4203.

Kurian, Allison W., Elisha Hughes, Elizabeth A. Handorf, Alexander Gutin, Brian Allen, Anne-Renee Hartman a Michael J. Hall, 2017. Breast and Ovarian Cancer Penetrance Estimates Derived From Germline Multiple-Gene Sequencing Results in Women. *JCO Precision Oncology* [online]. (1), 1–12. Dostupné z: doi:10.1200/PO.16.00066

Kurman, Robert J. a Ie-Ming Shih, 2016. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *The American Journal of Pathology* [online]. **186**(4), 733–747. ISSN 1525-2191. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajpath.2015.11.011

Lassen, Ulrik N, Lydia E Makaroff, Albrecht Stenzinger, Antoine Italiano, Gilles Vassal, Jesus Garcia-Foncillas a Bernard Avouac, 2021. Precision oncology: a clinical and patient perspective. *Future Oncology* [online]. [vid. 2021-07-22]. ISSN 1479-6694. Dostupné z: doi:10.2217/fon-2021-0688

Ledermann, Jonathan A. a Eric Pujade-Lauraine, 2019. Olaparib as maintenance treatment for patients with platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* [online]. **11**, 1758835919849753. ISSN 1758-8340. Dostupné z: doi:10.1177/1758835919849753

Lee, Anbok, Byung In Moon a Tae Hyun Kim, 2020a. BRCA1/BRCA2 Pathogenic Variant Breast Cancer: Treatment and Prevention Strategies. *Annals of Laboratory Medicine* [online]. **40**(2), 114–121. ISSN 2234-3814. Dostupné z: doi:10.3343/alm.2020.40.2.114

Lee, Sanghoon, Li Zhao, Christine Rojas, Nicholas W. Bateman, Hui Yao, Olivia D. Lara, Joseph Celestino, Margaret B. Morgan, Tri V. Nguyen, Kelly A. Conrads, Kelly M. Rangel, Robert L. Dood, Richard A. Hajek, Gloria L. Fawcett, Randy A. Chu, Katlin Wilson, Jeremy L. Loffredo, Coralie Viollet, Amir A. Jazaeri, Clifton L. Dalgard, Xizeng Mao, Xingzhi Song, Ming Zhou, Brian L. Hood, Nirad Banskota, Matthew D. Wilkerson, Jerez Te, Anthony R. Soltis, Kristin Roman, Andrew Dunn, David Cordover, Agda Karina Eterovic, Jinsong Liu, Jared K. Burks, Keith A. Baggerly, Nicole D. Fleming, Karen H. Lu, Shannon N. Westin, Robert L. Coleman, Gordon B. Mills, Yovanni Casablanca, Jianhua Zhang, Thomas P. Conrads, George L. Maxwell, P. Andrew Futreal a Anil K. Sood, 2020b. Molecular Analysis of Clinically Defined Subsets of High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cell Reports* [online]. **31**(2), 107502. ISSN 2211-1247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2020.03.066

Lee, Yi-Ying, Chien-Feng Li, Ching-Yih Lin, Sung-Wei Lee, Ming-Jen Sheu, Li-Ching Lin, Tzu-Ju Chen, Ting-Feng Wu a Chung-Hsi Hsing, 2014. Overexpression of CPS1 is an independent negative prognosticator in rectal cancers receiving concurrent chemoradiotherapy. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* [online]. **35**(11), 11097–11105. ISSN 1423-0380. Dostupné z: doi:10.1007/s13277-014-2425-8

Levine, Douglas A., 2013. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* [online]. **497**(7447), 67–73. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature12113

Lie, Shervi, Tingting Wang, Briony Forbes, Christopher G. Proud a Janni Petersen, 2019. The ability to utilise ammonia as nitrogen source is cell type specific and intricately linked to GDH, AMPK and mTORC1. *Scientific Reports* [online]. **9**(1), 1461. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-37509-3

Lin, Victor T. G. a Fang-Tsyr Lin, 2011. TRIP6: An adaptor protein that regulates cell motility, antiapoptotic signaling and transcriptional activity. *Cellular Signalling* [online]. **23**(11), 1691–1697. ISSN 0898-6568. Dostupné z: doi:10.1016/j.cellsig.2011.06.004

Lin, Victor T. G., Vivian Y. Lin, Yun-Ju Lai, Chen-Shan Chen, Kang Liu, Weei-Chin Lin a Fang-Tsyr Lin, 2013. TRIP6 Regulates p27KIP1 To Promote Tumorigenesis. *Molecular and Cellular Biology* [online]. **33**(7), 1394–1409. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.01149-12

Ling, Yiting, Chenxi Cao, Sengjuan Li, Min Qiu, Guixing Shen, Zhenwei Chen, Fei Yao a WenBin Chen, 2019. TRIP6, as a target of miR-7, regulates the proliferation and metastasis of colorectal cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **514**(1), 231–238. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2019.04.092

Liu, Hongyan, Huijia Dong, Keith Robertson a Chen Liu, 2011. DNA methylation suppresses expression of the urea cycle enzyme carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1) in human hepatocellular carcinoma. *The American Journal of Pathology* [online]. **178**(2), 652–661. ISSN 1525-2191. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajpath.2010.10.023

Liu, Shiru, Lawrence Kasherman, Rouhi Fazelzad, Lisa Wang, Genevieve Bouchard-Fortier, Stephanie Lheureux a Monika K. Krzyzanowska, 2021. The use of bevacizumab in the modern era of targeted therapy for ovarian cancer: A systematic review and meta-analysis. *Gynecologic Oncology* [online]. **161**(2), 601–612. ISSN 00908258. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygyno.2021.01.028

Liu, Ting, Lingyun Zhang, Donghyun Joo a Shao-Cong Sun, 2017. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. **2**(1), 1–9. ISSN 2059-3635. Dostupné z: doi:10.1038/sigtrans.2017.23

Liu, Wei, Li Cheng, Qingning Li a Juehua Jing, 2020. TRIP6 regulates the proliferation, migration, invasion and apoptosis of osteosarcoma cells by activating the NF-κB signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine* [online]. **19**(3), 2317–2325. ISSN 1792-0981. Dostupné z: doi:10.3892/etm.2020.8466

Liu, Weijun a Xiaowei Wang, 2019. Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data. *Genome Biology* [online]. **20**(1), 18. ISSN 1474-760X. Dostupné z: doi:10.1186/s13059-019-1629-z

Liu, Xiaodong, 2019. ABC Family Transporters. In: Xiaodong Liu a Guoyu Pan, ed. *Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity* [online]. Singapore: Springer, Advances in Experimental Medicine and Biology, s. 13–100 [vid. 2021-07-15]. ISBN 9789811376474. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-13-7647-4\_2

Liu, Xuejun, Dongwei Yao, Cheng Liu, Yunjian Cao, Qiurong Yang, Zhichao Sun a Duo Liu, 2016. Overexpression of ABCC3 promotes cell proliferation, drug resistance, and aerobic glycolysis and is associated with poor prognosis in urinary bladder cancer patients. *Tumor Biology* [online]. **37**(6), 8367–8374. ISSN 1423-0380. Dostupné z: doi:10.1007/s13277-015-4703-5

- Liu, Yewei, Ting Yin, Yuanbo Feng, Marlein Cona, Gang Huang, Jianjun Liu, Shaoli Song, Yansheng Jiang, Johannes Swinnen, Guy Bormans, Uwe Himmelreich, Raymond Oyen a Yicheng Ni, 2015. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery* [online]. Dostupné z: doi:10.3978/j.issn.2223-4292.2015.06.01
- Lu, Thomas X. a Marc E. Rothenberg, 2018. MicroRNA. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. **141**(4), 1202–1207. ISSN 0091-6749. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2017.08.034
- Lujambio, Amaia a Scott W. Lowe, 2012. The microcosmos of cancer. *Nature* [online]. **482**(7385), 347–355. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature10888
- MacFarlane, Leigh-Ann a Paul R. Murphy, 2010. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics* [online]. **11**(7), 537–561. ISSN 1389-2029. Dostupné z: doi:10.2174/138920210793175895
- Mallen, Adrienne, T. Rinda Soong, Mary K. Townsend, Robert M. Wenham, Christopher P. Crum a Shelley S. Tworoger, 2018. Surgical prevention strategies in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* [online]. **151**(1), 166–175. ISSN 0090-8258. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygyno.2018.08.005
- Maloney, Sara M., Camden A. Hoover, Lorena V. Morejon-Lasso a Jenifer R. Prospero, 2020. Mechanisms of Taxane Resistance. *Cancers* [online]. **12**(11), 3323. Dostupné z: doi:10.3390/cancers12113323
- Mehta, Anurag, Dushyant Kumar, Prerna Chadha, Malini Goswami, Gayatri Vishwakarma, Manoj Panigrahi, Moushumi Suryavanshi a Ajit Panaych, 2019. Diagnostic ability of real-time quantitative polymerase chain reaction versus immunohistochemistry for Ki-67 assessment in breast cancer: An Indian perspective. *The Indian Journal of Medical Research* [online]. **150**(3), 254–260. ISSN 0971-5916. Dostupné z: doi:10.4103/ijmr.IJMR\_644\_18
- Mesci, Seda, Sevgi Marakli, Burak Yazgan a Tuba Yildirim, 2019. The effect of ATP-binding cassette (ABC) transporters in human cancers. *International Journal of Science Letters* [online]. **1**, 14–19. Dostupné z: doi:10.38058/ijsl.594000
- Miao, Xiaobing, Xiaohong Xu, Yaxun Wu, Xinghua Zhu, Xudong Chen, Chunsun Li, Xiaoyun Lu, Yali Chen, Yushan Liu, Jieyu Huang, Yuchan Wang a Song He, 2016. Overexpression of TRIP6 promotes tumor proliferation and reverses cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) via regulating nuclear p27Kip1 expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Tumor Biology* [online]. **37**(1), 1369–1378. ISSN 1423-0380. Dostupné z: doi:10.1007/s13277-015-3939-4
- Mikula-Pietrasik, Justyna, Anna Witucka, Martyna Pakula, Paweł Uruski, Beata Begier-Kraśńska, Arkadiusz Niklas, Andrzej Tykarski a Krzysztof Książek, 2019. Comprehensive review on how platinum- and taxane-based chemotherapy of ovarian cancer affects biology of normal cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. **76**(4), 681–697. ISSN 1420-682X, 1420-9071. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-018-2954-1
- Mohelnikova-Duchonova, B., M. Kocik, B. Duchonova, V. Brynychova, M. Oliverius, J. Hlavsa, E. Honsova, J. Mazanec, Z. Kala, I. Ojima, D. J. Hughes, J. E. Doherty, H. A. Murray, M. A. Crockard, R. Lemstrova a P. Soucek, 2017. Hedgehog pathway overexpression in pancreatic cancer is abrogated by new-generation taxoid SB-T-1216. *The Pharmacogenomics Journal* [online]. **17**(5), 452–460. ISSN 1473-1150. Dostupné z: doi:10.1038/tpj.2016.55



- Mollaei, Mojtaba, Zuhair Mohammad Hassan, Fatemeh Khorshidi a Ladan Langroudi, 2021. Chemotherapeutic drugs: Cell death- and resistance-related signaling pathways. Are they really as smart as the tumor cells? *Translational Oncology* [online]. **14**(5), 101056. ISSN 1936-5233. Dostupné z: doi:10.1016/j.tranon.2021.101056
- Motofei, Ion G., 2018. Biology of Cancer; From Cellular Cancerogenesis to Supracellular Evolution of Malignant Phenotype. *Cancer Investigation* [online]. **36**(5), 309–317. ISSN 0735-7907. Dostupné z: doi:10.1080/07357907.2018.1477955
- Muhammad, Nefertiti a Jiyeon Kim, 2020. Therapeutic Startegies for Cancer Sub-Types Overexpressing Cps. *Cancer Prevention*. **3**(1), 4.
- Murthy, Kishore K., Kristopher Clark, Yves Fortin, Shi-Hsiang Shen a Denis Banville, 1999. ZRP-1, a Zyxin-related Protein, Interacts with the Second PDZ Domain of the Cytosolic Protein Tyrosine Phosphatase hPTP1E\*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **274**(29), 20679–20687. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.274.29.20679
- Muth, Marsilla, Francis Ojara, Charlotte Kloft a Markus Joerger, 2020. Role of TDM-based dose adjustments for taxane anticancer drugs. *British Journal of Clinical Pharmacology* [online]. **87**. Dostupné z: doi:10.1111/bcp.14678
- Němcová-Fürstová, Vlasta, Dana Kopperová, Kamila Balušíková, Marie Ehrlichová, Veronika Brynychová, Radka Václavíková, Petr Daniel, Pavel Souček a Jan Kovář, 2016. Characterization of acquired paclitaxel resistance of breast cancer cells and involvement of ABC transporters. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. **310**, 215–228. ISSN 1096-0333. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2016.09.020
- Nikolaou, Michail, Athanasia Pavlopoulou, Alexandros G. Georgakilas a Efthymios Kyrodimos, 2018. The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. *Clinical & Experimental Metastasis* [online]. **35**(4), 309–318. ISSN 1573-7276. Dostupné z: doi:10.1007/s10585-018-9903-0
- Nitzahn, Matthew a Gerald S. Lipshutz, 2020. CPS1: Looking at an ancient enzyme in a modern light. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. **131**(3), 289–298. ISSN 1096-7192. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymgme.2020.10.003
- Nurgali, Kulmira, R. Thomas Jagoe a Raquel Abalo, 2018. Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae? *Frontiers in Pharmacology* [online]. **9**, 245. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2018.00245
- Ojima, Iwao, Brendan Lichtenthal, Siyeon Lee, Changwei Wang a Xin Wang, 2016. Taxane anticancer agents: a patent perspective. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* [online]. **26**(1), 1–20. ISSN 1354-3776, 1744-7674. Dostupné z: doi:10.1517/13543776.2016.1111872
- Ojima, Iwao, Xin Wang, Yunrong Jing a Changwei Wang, 2018. Quest for Efficacious Next-Generation Taxoid Anticancer Agents and Their Tumor-Targeted Delivery. *Journal of Natural Products* [online]. **81**(3), 703–721. ISSN 0163-3864. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jnatprod.7b01012
- Oliverius, Martin, Dominika Flašarová, Beatrice Mohelnikova-Duchonova, M Ehrlichova, Viktor Hlaváč, M Kocik, Ondřej Strouhal, P Dvorak, Iwao Ojima a Pavel Soucek, 2019. KRAS pathway expression changes in pancreatic cancer models by conventional and experimental taxanes. *Mutagenesis* [online]. **34**. Dostupné z: doi:10.1093/mutage/gez021

Oshiro, Connie, Sharon Marsh, Howard McLeod, Michelle Whirl Carrillo, Teri Klein a Russ Altman, 2009. Taxane pathway: *Pharmacogenetics and Genomics* [online]. **19**(12), 979–983. ISSN 1744-6872. Dostupné z: doi:10.1097/FPC.0b013e3283335277

Otová, Berta, Iwao Ojima, Radka Václavíková, Jiří Hrdý, Marie Ehrlichová, Pavel Souček, Jana Vobořilová, Vlasta Němcová, Ilaria Zanardi, Stanislav Horský, Jan Kovář a Ivan Gut, 2012. Second-generation taxanes effectively suppress subcutaneous rat lymphoma: role of disposition, transport, metabolism, *in vitro* potency and expression of angiogenesis genes. *Investigational New Drugs* [online]. **30**(3), 991–1002. ISSN 1573-0646. Dostupné z: doi:10.1007/s10637-011-9654-0

Peng, Yong a Carlo M. Croce, 2016. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. **1**(1), 1–9. ISSN 2059-3635. Dostupné z: doi:10.1038/sigtrans.2015.4

Piombino, Claudia, Laura Cortesi, Matteo Lambertini, Kevin Punie, Giovanni Grandi a Angela Toss, 2020. Secondary Prevention in Hereditary Breast and/or Ovarian Cancer Syndromes Other Than BRCA. *Journal of Oncology* [online]. **2020**, e6384190. ISSN 1687-8450. Dostupné z: doi:10.1155/2020/6384190

Prat, Jaime, 2015. FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication. *Journal of Gynecologic Oncology* [online]. **26**(2), 87–89. ISSN 2005-0380. Dostupné z: doi:10.3802/jgo.2015.26.2.87

QIAGEN, 2020. *AllPrep DNA/RNA Mini Handbook* [online]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/fi/resources/resourcedetail?id=e00044e1-a80b-4c54-8989-957207ac8be2&lang=en>

Ridder, Dirk Andreas, Mario Schindeldecker, Arndt Weinmann, Kristina Berndt, Lana Urbansky, Hagen Roland Witzel, Stefan Heinrich, Wilfried Roth a Beate Katharina Straub, 2021. Key Enzymes in Pyrimidine Synthesis, CAD and CPS1, Predict Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers* [online]. **13**(4), 744. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers13040744

Ryan, Randi, Ossama Tawfik, Roy A. Jensen a Shrikant Anant, 2017. Chapter Two - Current Approaches to Diagnosis and Treatment of Ductal Carcinoma In Situ and Future Directions. In: Rajkumar Lakshmanaswamy, ed. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [online]. B.m.: Academic Press, Approaches to Understanding Breast Cancer, s. 33–80 [vid. 2021-07-11]. Dostupné z: doi:10.1016/bs.pmbts.2017.08.001

Samadder, N. Jewel, Karthik V. Giridhar, Noemi Baffy, Douglas Riegert-Johnson a Fergus J. Couch, 2019. Hereditary Cancer Syndromes—A Primer on Diagnosis and Management: Part 1: Breast-Ovarian Cancer Syndromes. *Mayo Clinic Proceedings* [online]. **94**(6), 1084–1098. ISSN 0025-6196. Dostupné z: doi:10.1016/j.mayocp.2019.02.017

Schoor, Lori, Henkjan Verkade, Folkert Kuipers a Johan Jonker, 2014. New insights in the biology of ABC transporters ABCC2 and ABCC3: Impact on drug disposition. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* [online]. **11**, 1–21. Dostupné z: doi:10.1517/17425255.2015.981152

Smoter, Marta, Lubomir Bodnar, Renata Duchnowska, Rafał Stec a Bartłomiej Grala, 2011. The role of Tau protein in resistance to paclitaxel. *Cancer chemotherapy and pharmacology* [online]. **68**, 553–7. Dostupné z: doi:10.1007/s00280-011-1696-7

- Souček, Pavel, Pavel Anzenbacher, Ivana Skoumalová a Michal Dvořák, 2005. Expression of Cytochrome P450 Genes in CD34+ Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *STEM CELLS* [online]. **23**(9), 1417–1422. ISSN 1549-4918. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0066
- Stewart, Christine, Christine Ralyea a Suzy Lockwood, 2019. Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Seminars in Oncology Nursing* [online]. **35**(2), Gynecology Oncology, 151–156. ISSN 0749-2081. Dostupné z: doi:10.1016/j.soncn.2019.02.001
- Summar, M. L., L. D. Hall, A. M. Eeds, H. B. Hutcheson, A. N. Kuo, A. S. Willis, V. Rubio, M. K. Arvin, J. P. Schofield a E. P. Dawson, 2003. Characterization of genomic structure and polymorphisms in the human carbamyl phosphate synthetase I gene. *Gene* [online]. **311**, 51–57. ISSN 0378-1119. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-1119(03)00528-6
- Sun, Rui-Ping, Qian-Yun Xi, Jia-Jie Sun, Xiao Cheng, Yan-Ling Zhu, Ding-Ze Ye, Ting Chen, Li-Min Wei, Rui-Song Ye, Qing-Yan Jiang a Yong-Liang Zhang, 2016. In low protein diets, microRNA-19b regulates urea synthesis by targeting SIRT5. *Scientific Reports* [online]. **6**(1), 33291. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep33291
- Sun, Xiaoming a Paul D. Kaufman, 2018. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma* [online]. **127**(2), 175–186. ISSN 1432-0886. Dostupné z: doi:10.1007/s00412-018-0659-8
- Svoboda, Martin, Felicitas Mungenast, Andreas Gleiss, Ignace Vergote, Adriaan Vanderstichele, Jalid Sehouli, Elena Braicu, Sven Mahner, Walter Jäger, Diana Mechtcheriakova, Dan Cacsire-Tong, Robert Zeillinger, Theresia Thalhammer a Dietmar Pils, 2018. Clinical Significance of Organic Anion Transporting Polypeptide Gene Expression in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Frontiers in Pharmacology* [online]. **9**, 842. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2018.00842
- Todd, Adam A., Paul W. Groundwater a Jason H. Gill, 2017. *Anticancer therapeutics: from drug discovery to clinical applications*. First edition. Hoboken, NJ: Wiley. ISBN 978-1-118-69621-7.
- Tomášek, Jiří, 2015. *Onkologie: minimum pro praxi*. Praha: Axonite CZ. ISBN 978-80-88046-01-1.
- Tsang, Julia Y. S. a Gary M. Tse, 2020. Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances in Anatomic Pathology* [online]. **27**(1), 27–35. ISSN 1072-4109. Dostupné z: doi:10.1097/PAP.0000000000000232
- Vaclavikova, Radka, Pavel Soucek, Lenka Svobodova, Pavel Anzenbacher, Petr Simek, F. Guengerich a Ivan Gut, 2004. Different *in vitro* metabolism of paclitaxel and docetaxel in humans, rats, pigs, and minipigs. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* [online]. **32**, 666–74. Dostupné z: doi:10.1124/dmd.32.6.666
- Van de Wetering, Koen, Wouter Feddema, J. Bernd Helms, Jos F. Brouwers a Piet Borst, 2009. Targeted metabolomics identifies glucuronides of dietary phytoestrogens as a major class of MRP3 substrates in vivo. *Gastroenterology* [online]. **137**(5), 1725–1735. ISSN 1528-0012. Dostupné z: doi:10.1053/j.gastro.2009.06.052
- Velcheti, Vamsidhar a Kurt Schalper, 2016. Basic Overview of Current Immunotherapy Approaches in Cancer. *American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting* [online]. **35**, 298–308. ISSN 1548-8756. Dostupné z: doi:10.1200/EDBK\_156572

Vlasák, Pavel, Jiří Bouda, Jan Kost'ún a Denis Berezovskiy, 2018. Nové trendy v systémové léčbě ovariálního karcinomu. **10**(4). ISSN 1803-9588.

Vobořilová, Jana, Vlasta Nemcova, Jitka Neubauerová, Iwao Ojima, Ilaria Zanardi, Ivan Gut a Jan Kovář, 2009. Cell Death Induced by Novel Fluorinated Taxanes in Drug-Sensitive and Drug-Resistant Cancer Cells. *Investigational new drugs* [online]. **29**, 411–23. Dostupné z: doi:10.1007/s10637-009-9368-8

Vogel, Wendy H., 2017. Li-Fraumeni Syndrome. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology*. **8**(7), 742–746. ISSN 2150-0878.

Vokurka, Samuel a Petra Tesařová, 2018. *Onkologie v kostce*. Praha: Current Media. ISBN 978-80-88129-37-0.

Vorlíček, Jiří, Jitka Abrahámová a Hilda Vorlíčková, 2012. *Klinická onkologie pro sestry*. 2. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3742-3.

Wang, Xuan, Haiyun Zhang a Xiaozhuo Chen, 2019. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance* [online]. **2**(2), 141–160. Dostupné z: doi:10.20517/cdr.2019.10

Wang, Ya, Xiaomei Zhang, Boyuan Zhao, Zhiling Xu a Yonggang Lv, 2020. Suspension State Promotes Drug Resistance of Breast Tumor Cells by Inducing ABCC3 Overexpression. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. **190**(2), 410–422. ISSN 1559-0291. Dostupné z: doi:10.1007/s12010-019-03084-0

Wang, Yuan a Thomas D. Gilmore, 2001. LIM domain protein Trip6 has a conserved nuclear export signal, nuclear targeting sequences, and multiple transactivation domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. **1538**(2), 260–272. ISSN 0167-4889. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-4889(01)00077-5

Weaver, Beth A., 2014. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular Biology of the Cell* [online]. **25**(18), 2677–2681. ISSN 1059-1524. Dostupné z: doi:10.1091/mbc.e14-04-0916

West, Ann-Katrine Vranso, Lena Wullkopf, Amalie Christensen, Natascha Leijnse, Jens Magelund Tarp, Joachim Mathiesen, Janine Terra Erler a Lene Broeng Oddershede, 2017. Division Induced Dynamics in Non-Invasive and Invasive Breast Cancer. *Biophysical Journal* [online]. **112**(3), 123a. ISSN 0006-3495. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2016.11.687

Willier, Semjon, Elke Butt, Günther H. S. Richter, Stefan Burdach a Thomas G. P. Grunewald, 2011. Defining the role of TRIP6 in cell physiology and cancer. *Biology of the Cell* [online]. **103**(12), 573–591. ISSN 1768-322X. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1042/BC20110077

Wu, Geting, Zijin Zhao, Yuanliang Yan, Yangying Zhou, Jie Wei, Xi Chen, Wei Lin, Chunlin Ou, Jia Li, Xiang Wang, Kun Xiong, Jianhua Zhou a Zhijie Xu, 2020a. CPS1 expression and its prognostic significance in lung adenocarcinoma. *Annals of Translational Medicine* [online]. **8**(6), 341. ISSN 2305-5839. Dostupné z: doi:10.21037/atm.2020.02.146

Wu, Kun-Zhe, Chun-Dong Zhang, Cheng Zhang, Jun-Peng Pei a Dong-Qiu Dai, 2020b. miR-665 Suppresses the Epithelial-Mesenchymal Transition and Progression of Gastric Cancer by Targeting CRIM1. *Cancer Management and Research* [online]. **12**, 3489–3501. ISSN 1179-1322. Dostupné z: doi:10.2147/CMAR.S241795

Yamauchi, Hideko a Junko Takei, 2018. Management of hereditary breast and ovarian cancer. *International Journal of Clinical Oncology* [online]. **23**(1), 45–51. ISSN 1437-7772. Dostupné z: doi:10.1007/s10147-017-1208-9

Yang, Fan, Long Li, Jianhua Zhang, Jin Zhang a Lei Yang, 2020. TRIP6 accelerates the proliferation and invasion of cervical cancer by upregulating oncogenic YAP signaling. *Experimental Cell Research* [online]. **396**(1), 112248. ISSN 0014-4827. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexcr.2020.112248

Zhang, Lei, Ying Chen a Ke Wang, 2019. Comparison of CA125, HE4, and ROMA index for ovarian cancer diagnosis. *Current Problems in Cancer* [online]. **43**(2), 135–144. ISSN 0147-0272. Dostupné z: doi:10.1016/j.currproblcancer.2018.06.001

Zhang, Linbo, Ping Huang, Chunxia Huang, Lingmei Jiang, Zhijie Lu a Peng Wang, 2021. Varied clinical significance of ATP-binding cassette C sub-family members for lung adenocarcinoma. *Medicine* [online]. **100**(16), e25246. ISSN 1536-5964. Dostupné z: doi:10.1097/MD.00000000000025246

Zhang, Yun-Kai, Yi-Jun Wang, Pranav Gupta a Zhe-Sheng Chen, 2015. Multidrug Resistance Proteins (MRPs) and Cancer Therapy. *The AAPS Journal* [online]. **17**(4), 802–812. ISSN 1550-7416. Dostupné z: doi:10.1208/s12248-015-9757-1

Zhao, Wenhui, Yubin Dai, Ting Dai, Tian Xie, Xiaobo Su, Jing Li, Xiang Zhou, Kewei Meng a Xiaohui Zhao, 2017. TRIP6 promotes cell proliferation in hepatocellular carcinoma via suppression of FOXO3a. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **494**(3–4), 594–601. ISSN 1090-2104. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2017.10.117

Zhao, Xiaohui, Chao Jiang, Rui Xu, Qingnan Liu, Guanglin Liu a Yan Zhang, 2020. TRIP6 enhances stemness property of breast cancer cells through activation of Wnt/ $\beta$ -catenin. *Cancer Cell International* [online]. **20**(1), 51. ISSN 1475-2867. Dostupné z: doi:10.1186/s12935-020-1136-z

Zhao, Xin-Ge, Jing-Ye Hu, Jun Tang, Wei Yi, Mei-Yin Zhang, Rong Deng, Shi-Juan Mai, Nuo-Qing Weng, Rui-Qi Wang, Ji Liu, Hui-Zhong Zhang, Jie-Hua He a Hui-Yun Wang, 2019. miR-665 expression predicts poor survival and promotes tumor metastasis by targeting NR4A3 in breast cancer. *Cell Death & Disease* [online]. **10**(7), 479. ISSN 2041-4889. Dostupné z: doi:10.1038/s41419-019-1705-z

Zheng, Hua-Chuan, 2017. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget* [online]. **8**(35), 59950–59964. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.19048

Zheng, Xiaobin, Neal Andruska, Michael J. Lambrecht, Sisi He, Amadeo Parissenti, Paul J. Hergenrother, Erik R. Nelson a David J. Shapiro, 2016. Targeting multidrug-resistant ovarian cancer through estrogen receptor  $\alpha$  dependent ATP depletion caused by hyperactivation of the unfolded protein response. *Oncotarget* [online]. **9**(19), 14741–14753. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.10819

Zheng, Xiaowei, Changwei Wang, Yuanming Xing, Siying Chen, Ti Meng, Haisheng You, Iwao Ojima a Yalin Dong, 2017. SB-T-121205, a next-generation taxane, enhances apoptosis and inhibits migration/invasion in MCF-7/PTX cells. *International Journal of Oncology* [online]. **50**(3), 893–902. ISSN 1019-6439. Dostupné z: doi:10.3892/ijo.2017.3871

Zhu, Lirong, Xiaodong Xu, Yijie Tang a Xiaochao Zhu, 2019. TRIP6 functions as a potential oncogene and facilitated proliferation and metastasis of gastric cancer. *Biologics: Targets & Therapy* [online]. **13**, 101–110. ISSN 1177-5475. Dostupné z: doi:10.2147/BTT.S191863

Zikán, Michal, 2016. Gynecological Care and Prevention of Gynecological Malignancies in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *Klinická onkologie* [online]. **29**(Suppl 1), S22–S30. ISSN 0862495X, 18025307. Dostupné z: doi:10.14735/amko2016S22

### **Další zdroje:**

Koucká, Kamila. (2018): Účinky a molekulární změny vyvolané působením nových taxanů v experimentálních modelech a u pacientů se solidními nádory. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha.

QIAGEN, 2020. *AllPrep DNA/RNA Mini Handbook*. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/fi/resources/resourcedetail?id=e00044e1-a80b-4c54-8989-957207ac8be2&lang=en>

Terese Winslow LLC, Medical And Scientific Illustration, dostupné z: <https://www.teresewinslow.com/>

[http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT\\_CDS/index](http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT_CDS/index)

[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)

<http://mirdb.org/>

<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>

<https://www.svod.cz/>



# The role of TRIP6, ABCC3, and CPS1 in efficacy of novel MDR-reversal Stony Brook taxanes in ovarian cancer

Karolina Seborova <sup>1,2</sup>, Alzbeta Spalenkova <sup>1,2,3</sup>, Kamila Koucka <sup>1,2</sup>, Petr Holy <sup>1,2,3</sup>, Iveta Voleska <sup>1</sup>, Marie Ehrlichova <sup>1,2</sup>, Changwei Wang <sup>4</sup>, Iwao Ojima <sup>4</sup>, Petr Daniel <sup>5</sup>, Kamila Balusikova <sup>5</sup>, Michael Jelinek <sup>5</sup>, Jan Kovar <sup>5</sup>, Lukas Rob <sup>6</sup>, Martin Hruda <sup>6</sup>, Marcela Mrhalova <sup>7</sup>, Pavel Soucek <sup>1,2</sup> and Radka Vaclavikova <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic; karolina.seborova@szu.cz (K.S.); alzbeta.spalenkova@szu.cz (A.S.); kamila.koucka@szu.cz (K.K.); petr.holy@szu.cz (P.H.); marie.ehrlichova@szu.cz (M.E.); radka.vaclavikova@szu.cz (R.V.)

<sup>2</sup> Laboratory of Pharmacogenomics, Biomedical Center, Faculty of Medicine, Charles University, Pilsen, Czech Republic; pavel.soucek@lfp.cuni.cz (P.S.)

<sup>3</sup> Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

<sup>4</sup> Institute of Chemical Biology & Drug Discovery, Stony Brook University - State University of New York, Stony Brook, USA; iwao.ojima@stonybrook.edu (I.O.); wachangw@gmail.com (C.W.)

<sup>5</sup> Division of Cell and Molecular Biology, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic; petr.daniel@lf3.cuni.cz (P.D.); kamila.balusikova@lf3.cuni.cz (K.B.); michael.j@email.cz (M.J.); jan.kovar@lf3.cuni.cz (J.K.)

**Citation:** Lastname, F.; Lastname, F.;

Lastname, F. Title. *Pharmaceuticals*

2021, 14, x.

<https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname

Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors.

Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

<sup>6</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Third Faculty of Medicine and University Hospital Kralovske Vinohrady, Prague, Czech Republic; lukas.rob@fnkv.cz (L.R.); martin.hruda@fnkv.cz (M.H.)

<sup>7</sup> Department of Pathology and Molecular Medicine, Second Faculty of Medicine and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic; marcela.mrhalova@lfmotol.cuni.cz (M.M.)

\* Correspondence: radka.vaclavikova@szu.cz; Tel.: +420 267 082 709

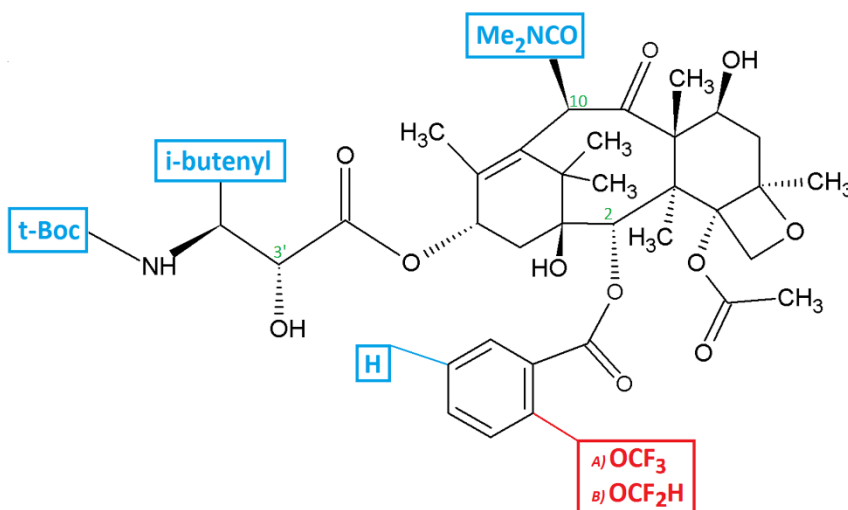
**Abstract:** The main problem precluding successful therapy with conventional taxanes is *de novo* or acquired resistance to taxanes. Therefore, novel experimental taxane derivatives (Stony Brook taxanes; SB-Ts) are synthesized and tested as potential drugs against resistant solid tumors. Recently, we reported alterations in ABCC3, CPS1 and TRIP6 gene expression in breast cancer cell line resistant to paclitaxel. Here, our study aimed to validate the potential role of these three candidate determinants in the mechanism of paclitaxel action and new experimental Stony Brook taxanes of the third generation (SB-T-121605 and SB-T-121606) in highly resistant ovarian carcinoma cells *in vitro* and corresponding *in vivo* models of mouse tumor xenografts as well as in ovarian carcinoma patients. The present study observed changes in mRNA and protein profiles of ABCC3, CPS1, and TRIP6 after the treatment of resistant ovarian cancer models with paclitaxel and Stony Brook taxanes *in vitro* and *in vivo*. Moreover, CPS1 overexpression could serve as a prognostic biomarkers of epithelial ovarian carcinoma patients' poor survival. On the basis of our results we can suggest that these candidate molecules deserve further investigations as potential therapeutic targets in human cancers.

**Keywords:** ovarian carcinoma, multidrug resistance, taxanes, Stony Brook taxanes, TRIP6, CPS1, ABCC3

## 1. Introduction

Ovarian cancer is the seventh most common cancer in women worldwide, with around 240,000 new cases per year [1]. Most of these are epithelial ovarian carcinomas (EOCs) with the main aggressive histological subtype, the high-grade serous ovarian carcinoma (HGSC), accounting for 70% to 80% of all EOCs [2,3]. The high mortality of EOC is due to the absence of warning symptoms, biomarkers in body liquids, and specific screening procedures for detecting EOC in early stages. The lack of these factors contributes to the suboptimal management of EOC. About 75-80% of cases are diagnosed at an advanced stage and have therefore poor prognosis with the 5-year survival rate of only 30% [4–6]. Similar to many other types of cancer, intrinsic or acquired multidrug resistance (MDR) to chemotherapy at advanced stages of EOC is the main problem preventing successful therapy [7,8].

The present standard therapeutic management of EOC consists platinum-based chemotherapy, usually in combination with taxanes [9,10]. Resistance to conventional taxanes was recently summarized by Das et al. 2021, demonstrating the roles of alterations in microtubule or microtubule-associated proteins, alterations in the expression and activity of multidrug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) superfamily including P-glycoprotein (P-gp/ABCB1), overexpression of anti-apoptotic proteins, or inhibition of apoptotic proteins and tumor-suppressor proteins. As well as modulation of signal transduction pathways associated with the activity of several cytokines, chemokines, and transcription factors [8] Resistance of EOC tumors to conventional anticancer therapies remains a serious problem and therefore new drugs and regimens to treat resistant tumors are sought. New therapeutic approaches, which have been introduced to the therapy of ovarian cancer recently, e.g., poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors (PARPi), such as olaparib, or antiangiogenic agents such as bevacizumab or pazopanib [11,12]. These agents showed promising results in clinical trials. Based on taxane structure, novel synthetic derivatives have been developed and synthesized, e.g., Stony Brook Taxanes (SB-Ts) with synthetic modifications at the C-2, C-10, and C-3' positions of paclitaxel (Figure 1) [13]. They seem to be highly effective in resistant cancer cells [14–19].



**Figure 1.** Structure formula of the novel taxane derivatives SB-T-121605 and SB-T-121606. Structures that differ from paclitaxel but are identical for new taxane derivatives are in blue. The different functional group between the two substances is in red – A) SB-T-121605 and B) SB-T-121606. Positions with synthetic modifications are in green (C-2, C-10, C-3').

Complete elucidation of tumor resistance mechanisms is also investigated in the frame of cell targets with potential use as therapeutic targets. By employing proteomic and other innovative approaches, several novel molecules potentially involved in the resistance of cancer cells to taxanes have been recently found. These molecules include ABCC3, CPS1, and TRIP6 [17,20,21]. The ATP-binding cassette (ABC) membrane transporters ABCC3 is overexpressed in the histological HGSC



subtype of EOC patients [22], and also in paclitaxel-resistant breast cancer [17] and ovarian cancer (A2780/PTX) cell lines [23]. The more prominent member of the superfamily P-glycoprotein (coded by *ABCB1*) is well-known for its association with the resistant phenotype of cancer cells [17]. Mitochondria play an essential role in apoptosis regulation and they are also essential for cell metabolism and respiration, and cell signaling [24–27]. One of the mitochondrial proteins called mitochondrial carbamoyl-phosphate synthetase I (CPS1) is significantly overexpressed in breast cancer-resistant cell lines [28]. Aside from *ABCC3* and *CPS1*, thyroid-hormone receptor interacting protein 6 (TRIP6) is also upregulated in paclitaxel-resistant breast cancer cells [21]. However, the expression profile of these molecules in resistant ovarian cancer cells as well as their roles in response to taxanes is completely unknown.

This study aimed to investigate the role of the three candidate molecules, *ABCC3*, *CPS1*, and *TRIP6* in the mechanism of action of paclitaxel and novel experimental Stony brook taxanes of the third generation (SB-T-121605 and SB-T-121606) *in vitro* in resistant ovarian carcinoma cells and corresponding *in vivo* models of mouse tumor xenografts. Synthesis of the third generation SB-Ts was described very recently [29]. The next aim of the study was to clarify whether *ABCC3*, *CPS1*, or *TRIP6* can serve as markers of prognosis, therapeutic response, and survival of ovarian carcinoma patients.

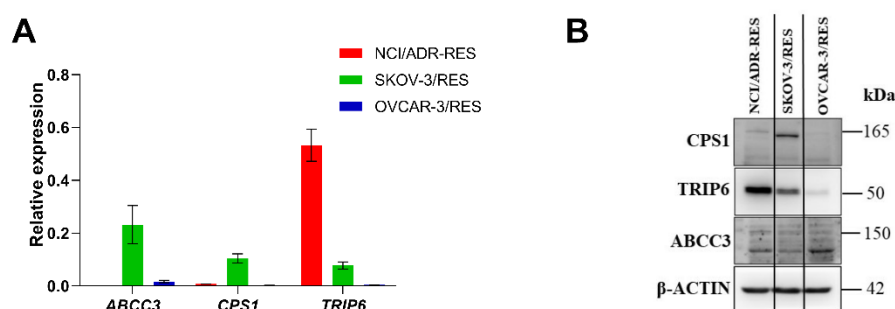
## 2. Results

### 2.1. mRNA and protein expression profile of *ABCC3*, *CPS1*, and *TRIP6* in resistant ovarian carcinoma cell lines

We compared levels of *ABCC3*, *CPS1*, and *TRIP6* mRNA and protein expression in various paclitaxel-resistant ovarian carcinoma cell lines; NCI/ADR-RES cell line cross-resistant to paclitaxel, and subclones of SKOV-3 and OVCAR-3 cells (named SKOV-3/RES and OVCAR-3/RES, respectively) with acquired resistance to paclitaxel.

In NCI/ADR-RES ovarian carcinoma cell line, we observed the highest level of *TRIP6* mRNA followed by *CPS1* and *ABCC3* mRNA (Figure 2A). In SKOV-3/RES cell subline, the highest level of *ABCC3* mRNA, followed by *CPS1* and *TRIP6* mRNAs was found. In the OVCAR-3/RES cell subline, the levels of all examined genes was low in the order: *ABCC3* > *TRIP6* > *CPS1* as shown in Figure 2A.

Protein expression of *TRIP6* and *CPS1* followed the same trend as observed at mRNA levels of those genes (Figure 2). *ABCC3* protein expression was slightly different between these resistant ovarian carcinoma cell lines, which is probably due to its low basal expression and difficulties with detection using immunoblotting. We selected the NCI/ADR-RES cell line for further study of SB-Ts effects *in vitro*. In addition, the expression profile of all genes reflected their expression in EOC tumor samples as described below.

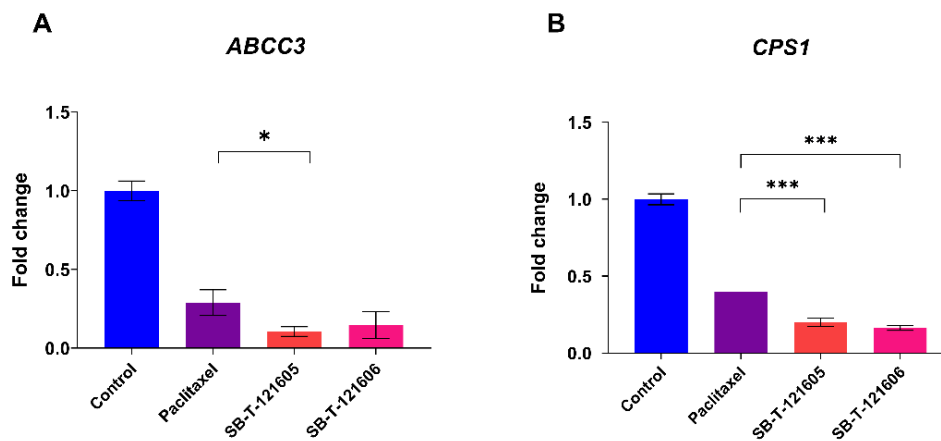


**Figure 2** –mRNA and protein levels of *ABCC3*, *CPS1*, and *TRIP6* in paclitaxel resistant NCI/ADR-RES, OVCAR-3/RES, and SKOV-3/RES ovarian carcinoma cell lines *in vitro*. (A) Relative mRNA expression was measured in technical triplicates. (B) Representative immunoblots of resistant ovarian carcinoma cell lines.

## 2.2. Effect of paclitaxel and novel Stony Brook taxanes on ABCC3, CPS1, and TRIP6 expression *in vitro*

We measured the mRNA expression level of *ABCC3*, *CPS1*, and *TRIP6* in NCI/ADR-RES ovarian carcinoma cell line after 48 hours cultivation with paclitaxel (3000 nM concentration for the drug-resistant cells as reported previously in [15], or novel generation taxanes SB-T-121605 (300nM) and SB-T-121606 (300 nM) in the death-inducing concentrations of SB-Ts in drug-resistant NCI/ADR-RES cells [16].

As shown in Figure 3A, treatment with taxanes led to the significantly decreased mRNA level of *ABCC3* and *CPS1* genes. The mRNA level of the *TRIP6* gene was unchanged after the treatment with taxanes in the NCI/ADR-RES ovarian carcinoma cell line (data not shown). The decrease in *ABCC3* mRNA level after the treatment with SB-Ts was approximately 2-times larger than after paclitaxel treatment as shown by fold-change analysis in Figure 3A. In the case of the *CPS1* gene, fold-change estimation showed a significantly decrease of *CPS1* mRNA level after the treatment with paclitaxel ( $P<0.001$ ), SB-T-121605 ( $P<0.001$ ), and SB-T-121606 ( $P<0.001$ , Figure 3B) in NCI/ADR-RES cell line. When we compared paclitaxel and SB-Ts treatments, we found significantly higher downregulation of *CPS1* after the treatment with novel SB-Ts for both SB-T-121605 ( $P<0.001$ ) and SB-T-121606 ( $P<0.001$ ) (Figure 3B).



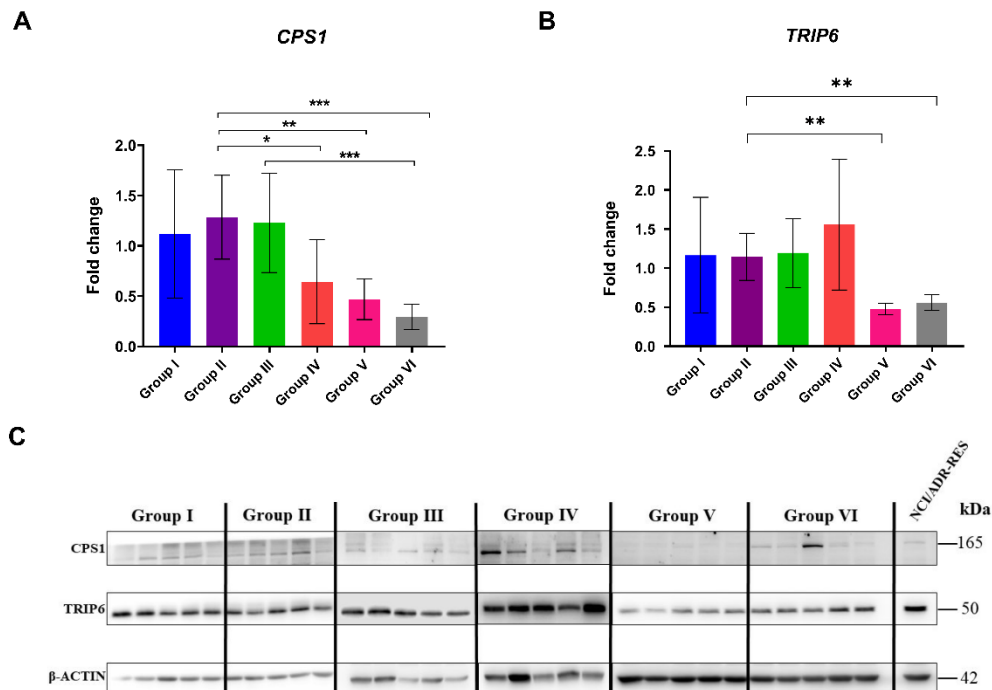
**Figure 3** – Significant differences in the expression of (A) *ABCC3* and (B) *CPS1* genes in NCI/ADR-RES cell line after the treatment with paclitaxel and novel Stony Brook taxanes, SB-T-121605 and SB-T-121606 *in vitro*. Difference in gene expression is displayed as mean of fold-change with  $\pm$  SD ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). Statistical analysis was performed by the two-tailed Student's t-test (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ). Expression was measured in technical triplicates.

## 2.3. Modulation of *ABCC3*, *CPS1*, and *TRIP6* expression by novel Stony Brook taxanes *in vivo*

We then measured changes in the expression of *ABCC3*, *CPS1*, and *TRIP6* genes in mouse xenograft model treated with paclitaxel alone or in separate combinations with novel taxanes, SB-T-121605 and SB-T-121606, *in vivo*. Tumor xenograft models of resistant ovarian cancer were prepared from the NCI/ADR-RES cell line, and each experimental group consisted of five mice.

When compared to the control group I, we did not find any significant changes of the examined mRNA levels in the paclitaxel group (Group II). On the other hand, we found a significant decrease in the expression of the *CPS1* gene after the treatment with novel taxanes in combination with paclitaxel. Particularly, significant downregulation of the *CPS1* gene was found in ovarian tumors after the treatment with combinations of 9 mg/kg paclitaxel with 1 mg/kg SB-T-121606 (Group V;  $P=0.004$ ) and 7 mg/kg paclitaxel with 3 mg/kg SB-T-121606 (Group VI;  $P<0.001$ ) compared to paclitaxel alone (Group II, Figure 4A). Expression of *CPS1* was also downregulated by 7 mg/kg paclitaxel with 3 mg/kg SB-T-121605 combination (Group IV) compared to paclitaxel alone (Group II;  $P=0.042$ , Figure 4A). Downregulation of the *CPS1* gene after the treatment with taxanes *in vivo* was in concordance with results observed in NCI/ADR-RES cells treated with taxanes *in vitro* (Figure 3). Furthermore, we found significant changes in

*TRIP6* mRNA level after the treatment with SB-Ts. Particularly, the treatment of mice with combinations of 9 mg/kg paclitaxel with 1 mg/kg SB-T-1621606 (Group V,  $P=0.001$ ) and 7 mg/kg paclitaxel with 3 mg/kg SB-T-121606 (Group VI,  $P=0.003$ ) led to a significant decrease in the mRNA level of *TRIP6* gene in comparison to the group treated with paclitaxel alone (Group II) (Figure 4B). In contrast to *in vitro* experiments, the downregulation of *ABCC3* mRNA level was not found *in vivo* after the treatment of mice with taxanes (data not shown). However, the level of *ABCC3* expression *in vivo* was very low in general. To confirm the significant results found at the mRNA level, we measured the levels of CPS1 and TRIP6 proteins in all groups of the examined xenografts. The significant decrease of CPS1 and TRIP6 expression was also detected at protein levels for groups V and VI of combination regimens of paclitaxel and SB-T-121606 in comparison to the group treated with paclitaxel alone (Figure 4C). mRNA and protein levels of CPS1 correlated in Group III ( $P=0.037$ ) and Group IV ( $P=0.037$ ) by the Spearman's rho test.



**Figure 4** – Significant differences in the mRNA levels of (A) *CPS1* and (B) *TRIP6* genes and (C) CPS1 and TRIP6 proteins in ovarian carcinoma mouse xenografts after the treatment with paclitaxel and novel SB-Ts *in vivo*. Gene expression differences are shown as a mean of fold change ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )  $\pm$  SD, between the control group (Group I), group treated with 10 mg/kg paclitaxel (Group II), 9 mg/kg paclitaxel + 1 mg/kg SB-T-121605 (Group III), 7 mg/kg paclitaxel + 3 mg/kg SB-T-121605 (Group IV), 9 mg/kg paclitaxel + 1 mg/kg SB-T-121606 (Group V), and 7 mg/kg paclitaxel + 3 mg/kg SB-T-121606 (Group VI). Statistical analysis was performed by the two-tailed Student's t-test (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ). Each group consisted of five mice.

## 2.4. EOC study population

### 2.4.1 Patients characteristics

We further examined the expression profile of *ABCC3*, *CPS1*, and *TRIP6* directly in the cohort of EOC patients. Clinical data, response to the therapy, and survival of patients who provided tissue samples of EOC tumors (N=113) are in Table 1. Samples from 89 EOC patients were collected during primary surgery without any prior chemotherapy pretreatment (Pretreatment Group). Samples of the second group of patients (N=24) were collected during surgery after neoadjuvant cytotoxic therapy (NACT) using regimens containing paclitaxel in combination with platinum derivatives (Posttreatment Group) as described in detail in Table 1. The median age ( $\pm$  SD) at the time of diagnosis of patients with EOC was  $59.8 \pm 10.8$  years. Most of the EOC patients had High Grade Serous Ovarian Carcinomas (HGSC; 79.6%), grade 3 tumors (77.0%), and

advanced stages III and IV (81.4%). In order to determine therapy response, we divided all tumor samples based on the platinum-free interval (PFI), defined as the interval between the date of the last platinum dose and the date of relapse detection [30,31]. EOC patients were divided into platinum-resistant (N=23; PFI length < 6 months), partially platinum-sensitive (N=15; PFI length from 6 to 12 months) and fully platinum-sensitive (N=70; PFI length > 12 months). Disease progression occurred in 69 of 113 EOC patients and 43 EOC patients died. The median time to progression (TTP) ( $\pm$  SD) of EOC patients included in the study was 22 months. Tissue samples of 17 patients without morphological signs of primary ovarian carcinoma in their ovaries (ovarian leiomyoma, N=6; uterine leiomyoma, N=1; benign ovarian cyst, N=4; cervical carcinoma, N=2; endometrial carcinoma, N=2; sarcoma, N=1; benign cystadenofibroma, N=1) were used as controls.

**Table 1.** Clinical characteristics of EOC patients in the study

| <b>Characteristics</b>              | <b>EOC set<br/>N (%)*</b> |
|-------------------------------------|---------------------------|
| <b>Mean age at diagnosis, years</b> | 59.8 $\pm$ 10.8           |
| <b>FIGO Stage</b>                   |                           |
| I                                   | 8 (7.1)                   |
| II                                  | 11 (9.7)                  |
| III                                 | 83 (73.4)                 |
| IV                                  | 9 (8.0)                   |
| Not available                       | 2 (1.8)                   |
| <b>EOC type</b>                     |                           |
| HGSC                                | 90 (79.6)                 |
| Others                              | 21 (18.6)                 |
| Not available                       | 2 (1.8)                   |
| <b>Histological grade</b>           |                           |
| G1                                  | 7 (6.2)                   |
| G2                                  | 18 (15.9)                 |
| G3                                  | 87 (77.0)                 |
| Not available                       | 1 (0.9)                   |
| <b>Progression</b>                  |                           |
| Present                             | 69 (61.0)                 |
| Absent                              | 43 (38.1)                 |
| Not available                       | 1 (0.9)                   |
| <b>Death</b>                        |                           |
| Present                             | 43 (38.1)                 |
| Absent                              | 70 (61.9)                 |
| <b>Response</b>                     |                           |
| Fully platinum-sensitive            | 70 (61.9)                 |
| Platinum-resistant                  | 23 (20.4)                 |
| Partially platinum-sensitive        | 15 (13.3)                 |
| Not available                       | 5 (4.4)                   |
| <b>Time to progression</b>          |                           |
| Median $\pm$ SD (months)            | 22.0 $\pm$ 18.9           |
| Number of evaluated patients        | 109 (96.5)                |

| Treatment   |           |
|---|-----------|
| Pretreatment group                                | 89 (78.8) |
| Posttreatment group                               | 24 (21.2) |
| Therapeutic regimens                              |           |
| <i>Adjuvant Therapy of Pretreatment group</i>     |           |
| Paclitaxel and platinum derivatives               | 80 (89.9) |
| Platinum derivatives                              | 3 (3.4)   |
| Unknown   | 6 (6.7)   |
| <i>Posttreatment group</i>                        |           |
| <i>Neoadjuvant Therapy of Posttreatment Group</i> |           |
| Paclitaxel + platinum derivatives                 | 23 (95.8) |
| Cisplatin + etoposide                             | 1 (4.2)   |
| <i>Adjuvant Therapy of Posttreatment Group</i>    |           |
| Paclitaxel + Platinum derivatives                 | 21 (87.5) |
| Cisplatin + Etoposide                             | 2 (8.3)   |
| Platinum derivatives                              | 1 (4.2)   |

Footnotes:

\* Number of patients with percentage in parentheses is shown

EOC = epithelial ovarian cancer, SD = standard deviation

#### 2.4.2. ABCC3, CPS1, and TRIP6 expression profile in EOC patients

We measured the mRNA level of *ABCC3*, *CPS1*, and *TRIP6* in the cohorts of EOC patients (N=113) and control ovarian tissues without the presence of malignant cells (N=17). Level of mRNA of all genes was successfully detected in EOC tumors and control ovarian tissues. In concordance with results observed in the *in vitro* model of paclitaxel-resistant ovarian carcinoma cell line NCI/ADR-RES, we observed the highest level to be that of *TRIP6* mRNA, followed by *ABCC3* and *CPS1* transcripts. In EOC patients, the mRNA levels of the three genes correlated highly significantly with each other (the Spearman's rho test;  $P < 0.001$ ). Subsequently, we compared the mRNA level of *ABCC3*, *CPS1*, and *TRIP6* genes in EOC tumor samples with control ovarian tissues. The mRNA levels of *TRIP6* and *CPS1* were significantly decreased in EOC pretreatment and also posttreatment tumors in comparison to control ovarian tissue (Table 2). The mRNA level of the *ABCC3* gene was elevated in tumor samples before the chemotherapeutic treatment, while this effect disappeared after the treatment (Table 2). The same trend was observed in the *in vitro* model of ovarian carcinoma cell lines, where the treatments with taxanes caused downregulation of the *ABCC3* expression.

**Table 2.** Significant differences in the relative transcript levels of *TRIP6*, *CPS1*, and *ABCC3* mRNA between pretreatment (N=89) and posttreatment (N=24) ovarian carcinoma samples and control ovarian tissue samples (N=17).

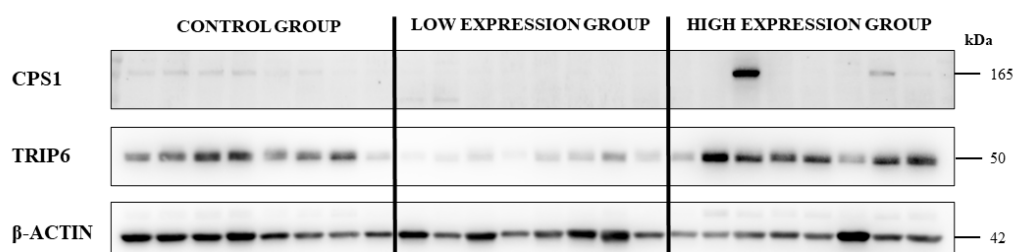
| Gene         | EOC pretreated tumors vs. control ovarian tissue | EOC posttreated tumors vs. control ovarian tissue |
|--------------|--|---|
| <i>ABCC3</i> | up*  | NS  |
| <i>CPS1</i>  | down***  | down***   |
| <i>TRIP6</i> | down***  | down***   |

Footnotes:

up = upregulation, down = downregulation, NS = not significant

P-value calculated by the REST2009 Software program (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

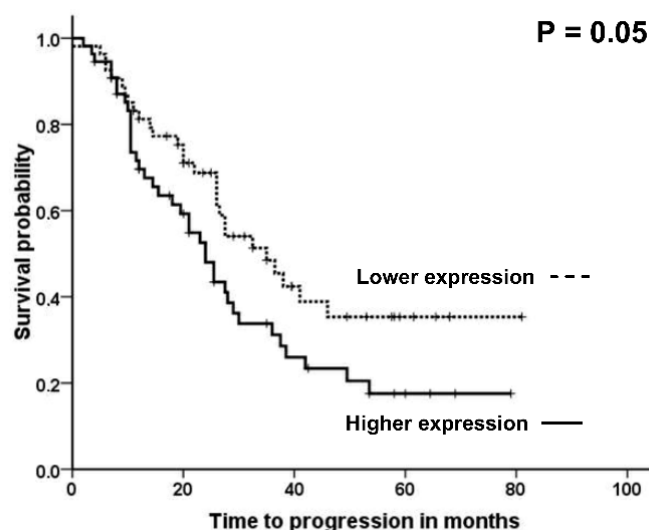
Subsequently, we compared the expression of mRNA levels of *CPS1* and *TRIP6* with their protein levels in representative sets of control ovarian tissues and EOC tumor samples divided into EOC low and high mRNA expression groups (Figure 5). Although the exact levels of mRNA and protein did not correlate, we found the same trend in their expression. Furthermore, downregulation of *CPS1* and *TRIP6* protein in the low mRNA expression group was highly significant (Student's t-test;  $P < 0.01$ ) in comparison to control ovarian tissues. *TRIP6* protein expression was also significantly higher in the high mRNA expression group compared to the low expression group of EOC patients (Student's t-test;  $P < 0.01$ ), as shown in Figure 5.



**Figure 5** - Protein levels of *CPS1* and *TRIP6* in control ovarian tissues and EOC patients divided according to their mRNA expression to low and high expression groups. Protein levels were estimated in tumor and control ovarian tissues by immunoblotting. Each group consisted of eight randomly selected samples.

#### 2.4.3. Association of *ABCC3*, *CPS1*, and *TRIP6* gene expression with clinical data

Finally, we compared the expression of *ABCC3*, *CPS1*, and *TRIP6* genes with clinical data of EOC patients, such as grade, stage, histology type, progression of the disease, therapeutic response, and survival estimated as TTP. There was no association between mRNA expression of *ABCC3*, *CPS1*, and *TRIP6* and pathological data, the prognosis of EOC, progression, or therapeutic response estimated based on PFI. On the other hand, we found a suggestive association of *CPS1* mRNA expression with TTP of EOC patients. Patients with higher than median intra-tumoral *CPS1* gene expression had significantly shorter TTP than the rest of the patients (Figure 6; the log rank test;  $P=0.05$ ). Survival analysis was performed by the Kaplan-Meier method, and the log-rank test was applied to identify significant associations.



**Figure 6.** Association between expression level of *CPS1* gene and time to progression of EOC patients. Survival curves for patients with the intratumoral *CPS1* expression levels above the median (solid line,  $n=55$ ) vs. patients with lower expression than the median (dashed line,  $n=54$ ) are displayed. Results evaluated by the Kaplan-Meier plot. Significance was evaluated by the log-rank test.

### 3. Discussion

The main problems in the successful treatment of ovarian carcinoma are late diagnosis of this disease and the MDR phenomenon. At present, new therapeutics and molecular targets in the therapy of resistant ovarian tumors are needed together with biomarkers indicating which drugs offer the highest chance for successful treatment. In our previous publications, we reported several new molecules involved or potentially involved in the resistance of cancer cells to taxanes, such as ABCC3, CPS1, and TRIP6 [17,20,21,28]. In the present study, we investigated the role of these candidate molecules in the efficacy of a conventional taxane, paclitaxel, and synthetic derivatives Stony Brook taxanes *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, we also explored the impact of ABCC3, CPS1, and TRIP6 mRNA and protein levels on prognosis and the therapeutic outcome in EOC patients.

Dysregulations of the expression of ABC membrane transporters, e.g., ABCB1, ABCC1, ABCC2, and ABCG2, can be associated with the development of MDR [32–34], but ABCC3 (alias MRP3; member of ABCC subfamily), active in the transport of conjugated organic anions, toxicants, drugs, and endogenous compounds, remains less explored. ABCC3 is associated with the sensitivity to anticancer drugs such as methotrexate or docetaxel and selective estrogen receptor modulator tamoxifen (as summarized in [35]). ABCC3 is also involved in glutathione transport in ovarian cancer cells [32]. We described previously that it is in overexpressed subclones of breast cancer cell lines MCF-7 and SK-BR-3 with acquired resistance to paclitaxel when comparing with parental paclitaxel-sensitive MCF-7 and SK-BR-3 clones [17]. Recent reports demonstrated that disruption of ABCC3 function reduces pancreatic cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* [36,37]. In ovarian cancer, ABCC3 protein is overexpressed in paclitaxel-resistant A2780/PTX cell line *in vitro* [23] and upregulated on the transcript level in histological HGSC subtype of EOC patients [22]. In the present study, we found upregulation of ABCC3 in EOC tumors compared to benign ovarian tissues. This observation is in concordance with the previous study, which described significantly elevated ABCC3 gene expression in recurrent cancer lesions compared to benign ovarian tissue [38]. Moreover, we observed that the ABCC3 level was decreased after neoadjuvant chemotherapy of EOC patients with a regimen combining taxanes and platinum derivatives. We observed here the same effect also in the highly paclitaxel-resistant ovarian cancer cells (NCI/ADR-RES) *in vitro* after the treatment with paclitaxel or new synthetic Stony Brook taxanes, which are highly effective in the resistant type of tumor cells [14–16,19,29,34]. The strong decrease of ABCC3 expression after the treatment with taxanes suggests that ABCC3 may play a role in taxane transport. Thus, ABCC3 seems to be a novel and promising therapeutic target for ovarian carcinomas, where taxanes are usually used. Congruently, epigenetic regulation of ABCC3 expression by the overexpression of miRNA-200a *in vitro* enhanced the chemosensitivity of paclitaxel-resistant ovarian SKOV-3 and ES-2 cell lines to paclitaxel [39]. ABCC3 gene was also co-expressed with the non-coding RNAs, CTD-2589M5.4 [23]. In connection to novel therapeutic strategies in ovarian cancer, novel interactions between olaparib and ABCC3 were found very recently [40].

Our study also shows that taxane treatment leads to dysregulation of CPS1 expression (carbamoyl phosphate synthetase 1) in resistant ovarian cancer models. Moreover, the higher CPS1 gene expression level is associated with the survival of EOC patients. CPS1 is a mitochondrial enzyme catalyzing the first step of the urea cycle significantly. Was found upregulated in breast cancer MCF-7 cells with acquired resistance to paclitaxel when comparing with original sensitive MCF-7 cells [28]. Only a few studies demonstrated the potential association of CPS1 with tumor resistance [41,42], and the role of this mitochondrial protein in ovarian cancer remained completely unknown to date. Very recently, CPS1 downregulation of CPS1 expression in hepatocellular carcinomas and a further reduction in recurrent tumors and distant metastases was reported [43]. CPS1 knockdown stimulates soluble adenylyl cyclase expression, thereby increasing cyclic AMP (cAMP) synthesis and stimulating PKA-CREB/ATF1 signaling. Regulation of cAMP-PKA-CREB/ATF1 signaling represents a non-canonical function of CPS1, and targeting of the PKA-CREB/ATF1 axis may improve the therapeutic effects of aspirin in hepatocellular carcinoma [44]. Combining knockdown of CPS1 with EGFR inhibition reduces

cell proliferation and impedes cell-cycle progression. Thus, suppression of CPS1 potentiates the effects of EGFR inhibition [45]. Among other regulators, CPS1 is activated in the presence of N-acetyl-L-glutamate (NAG) [46] and its transcription is negatively regulated by liver kinase B1 in lung adenocarcinoma cell lines [47,48]. Briefly, CPS1 functions in different ways depending on cell and tissue type and the presence of its activators. The present study observed for the first time a significantly decreased expression of CPS1 in the NCI/ADR-RES paclitaxel-resistant ovarian cancer cells *in vitro* and the same effect also in the NCI/ADR-RES-xenografted mouse model *in vivo* after taxane treatment. Moreover, EOC patients with higher CPS1 expression experienced a significantly shorter time to progression of their disease. Thus, our study shows that downregulation of the CPS1 gene may be a putative prognostic biomarker in EOC patients.

TRIP6 (thyroid hormone receptor interacting protein 6) is an adaptor protein involved in various types of signaling, including pro-survival and anti-apoptotic signaling. TRIP6 was described to be associated with tumor resistance [49,50]. Employing a proteomic approach, we have recently shown that TRIP6 is significantly upregulated in breast cancer MCF-7 cells with acquired resistance to paclitaxel compared to original sensitive MCF-7 cells. Furthermore, specific siRNA silencing revealed that TRIP6 is involved, together with ABCB1 transporter (P-glycoprotein), in the development of resistance of MCF-7 cells to paclitaxel [20,21]. In the present study we observed that TRIP6 is strongly overexpressed in paclitaxel-resistant EOC model NCI/ADR-RES *in vitro*. Although the expression of the TRIP6 gene or protein was unchanged by taxane treatment of resistant ovarian cancer cell lines *in vitro*, the treatment of mice xenografts based on NCI/ADR-RES model with experimental taxoid SB-T-121606 led to the TRIP6 protein downregulation *in vivo*. However, SB-T-121606 seems to cause downregulation of transcriptome in general by its extremely high efficacy towards resistant tumor cells. TRIP6 expression in tumor tissues from EOC patients was lower than that in control ovarian tissue and did not correlate with the survival of patients or their therapeutic outcome. In summary, our data show that TRIP6 is most probably not functionally connected with the studied paclitaxel resistance and cannot serve as a therapeutic target or prognostic biomarker in ovarian cancer at present.

In conclusion, this study revealed significant dysregulation of expression of candidate molecules, previously associated with MDR phenomena, in highly resistant ovarian carcinoma cell lines *in vitro* and also in their mouse xenograft *in vivo* version after the treatment with conventional paclitaxel and synthetic Stony Brook taxanes. Furthermore, significant dysregulation of ABCC3, CPS1, and TRIP6 expression in tumors from EOC patients was found. TRIP6 was not associated with the prognosis or survival of EOC patients, but CPS1 seems to associate with the survival of EOC patients. ABCC3 was overexpressed in EOC tumors, but after the treatment with taxanes, its upregulation disappeared. Our findings provide evidence that ABCC3 and CPS1 may act as mediators of therapy response in ovarian cancer cells. Future investigations should decipher molecular mechanisms of their function in cancer cells.

#### **4. Materials and Methods**

##### **4.1. Materials**

Paclitaxel for *in vitro* experiments was obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MA, USA). Novel third generation taxane derivatives (SB-T-121605 and SB-T-121606) were synthesized at the Institute of Chemical Biology & Drug Discovery (Stony Brook, NY, USA). Chemical structures of the drugs examined are shown in Figure 1. All taxanes were dissolved in DMSO for stock and working solutions. Infusion form of paclitaxel (Paclitaxel EBEWE 6 mg/l) for *in vivo* experiment was purchased from Ebewe Pharma Ges.m.n.H.NfG.KG., Austria).

##### **4.2. Cells and culture conditions**

Human ovarian carcinoma cell lines sensitive to paclitaxel - OVCAR-3 and SKOV-3 - were obtained from Cell Lines Service (CLS, Germany). A model of multi-drug resistant ovarian carcinoma - NCI/ADR-RES cell line - was obtained from National Cancer Institute (Frederick, MD, USA). All cell lines were cultivated in RPMI 1640 medium (PAN-Biotech, Germany) with L-glutamine (300 mg/l), NaHCO<sub>3</sub> (2,0 g/l), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), sodium



pyruvate (1 mM), HEPES (15 mM) and 10% fetal bovine serum (PAN-Biotech, Germany) at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Paclitaxel-resistant OVCAR-3/RES and SKOV-3/RES have been prepared by multistep selection procedure from OVCAR-3 and SKOV-3 cell lines cultivated in growth medium to final concentration of 300 nM (for OVCAR-3/RES), or 500 nM (for SKOV-3/RES) of paclitaxel. For expression analysis, cells were harvested as described in Chapter 4.3.

#### 4.3. Cell line treatment with paclitaxel and novel Stony Brook taxanes

NCI/ADR-RES cells were seeded in concentration  $4 \times 10^6$  cells into Petri dish and allowed to adhere overnight. After that, growth medium was replaced with fresh medium (control) or medium containing 3000 nM paclitaxel, 300 nM SB-T-121605 or 300 nM SB-T-161606. After 48 hours of incubation, cells were harvested by trypsinization and low-speed centrifugation, washed with PBS twice. Pellets were resuspended in 1 ml of TRIzol™ Reagent (Invitrogen™, CA, USA) and stored at -80 °C for later RNA isolation.

#### 4.4. Xenografts

The study conducted on xenografts was approved by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic and the Ethical Committee of the National Institute of Public Health in Prague. Female athymic Nude CrI:NU(NCr)-Foxn1<sup>nu</sup> mice, 4-6 weeks old, were obtained from Velaz, s.r.o. (Czech Republic). NCI/ADR-RES cells were harvested, and the pellet was washed twice by PBS. The animals were injected subcutaneously into the dorsal flanks with 200 µl of the cell suspension containing  $2 \times 10^6$  cells in PBS. The treatment with taxanes was initiated after tumors reached the size of approximately 100 mm<sup>3</sup>.

#### 4.5. In vivo treatment with paclitaxel and novel Stony Brook taxanes

In total, 30 xenografts were prepared and divided into six groups: (I) Control group (N=5) and experimental groups (N=5 each) as follows: (II) 10 mg/kg paclitaxel, (III) 9 mg/kg paclitaxel + 1 mg/kg SB-T-121605, (IV) 7 mg/kg paclitaxel + 3 mg/kg SB-T-121605, (V) 9 mg/kg paclitaxel + 1 mg/kg SB-T-121606, and (VI) 7 mg/kg paclitaxel + 3 mg/kg SB-T-121606. These regimens were administered intraperitoneally twice a week, 100 µl per each taxane solution. Control group I received 100 µl of 4% DMSO in Sterile water for tissue culture (PAN-Biotech, Germany) instead of taxanes. Mice were sacrificed on the day after the seventh dose or on the basis of their physical condition during taxane application. Tumor volume was measured by digital caliper in weekly intervals and expressed in mm<sup>3</sup> using the standard formula,  $(W^2 \times L)/2$ , where L and W are the major and minor diameters of the tumor in millimeters. Resected tumors were preserved in RNA later (Sigma-Aldrich, MO, USA) and stored at -80 °C till further processing.

#### 4.6. Patients cohort study

The present study tested ovarian carcinoma tissue samples obtained from 90 pretreatment and 24 posttreatment samples diagnosed with EOC at University Hospital Kralovske Vinohrady and Motol University Hospital (Prague, Czech Republic). Other 17 samples of ovarian tissues without morphological signs of carcinoma were used as controls in this study. Control samples were obtained from patients who underwent surgery for a different reason than ovarian malignancy. The tissue samples collected during surgery were histopathologically examined according to standard diagnostic procedures. The tissue samples were fresh-frozen and stored at -80 °C until isolation of RNA, DNA and protein. The following data on patients were retrieved from medical records: the patients age at the time of diagnosis, FIGO stage, tumor grade and type of EOC, expression of protein marker Ki67 in percentage points (available only for patients from Motol University Hospital), progression of disease, resistance to therapy (based on platinum derivatives), death, and time to progression (TTP) in months as specified in Table 1.

All patients were informed about the aims of the present study and provided their written consent to participate in the study. The design of the study was approved by the Ethics

Commission of the National Institute of Public Health (Prague, Czech Republic), University Hospital Kralovske Vinohrady, and Motol University Hospital).

#### 4.7. Isolation of nucleic acids and cDNA synthesis

Tumor tissue samples from animals and ovarian cancer patients were homogenized by mortar and pestle under liquid nitrogen. Total RNA, together with DNA and protein was isolated by AllPrep DNA/RNA/protein Mini kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's protocol. Total RNA from cells was isolated by TRIzol™ Reagent (Invitrogen™, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. RNA quantity was determined by Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Assay Kit (Invitrogen™, CA, USA) using Infinite M200 fluorescence reader (Tecan, Austria). Quality of RNA was assessed by estimating the RNA integrity number (RIN) using Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA). The RIN value was 8.6 on average (range 7.7 – 9.6). RNA was totally degraded in one carcinoma tissue sample and therefore was not further evaluated. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using 0.5 µg of total RNA by RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Lithuania) according to the manufacturer's protocol and its quality was confirmed by PCR amplification of Ubiquitin C fragment as described previously [51].

#### 4.8. Quantitative real-time PCR

Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed using TaqMan® Gene Expression Assays (ThermoFisher, MA, USA). TaqMan® Gene Expression Assays selected for this study were CPS1 (Hs00919490\_m1), TRIP6 (Hs00377979\_m1) and ABCC3 (Hs000358656\_m1). Highly stable expression of reference gene YWHAZ (Hs03044281\_g1) was used for normalization of results in used *in vitro* and *in vivo* models. Genes PPIA (Hs99999904\_m1), UBC (Hs00824723\_m1), and YWHAZ (Hs03044281\_g1) were used as reference genes for results normalization in ovarian cancer patients. The reaction mixture of cDNA from tumor samples contained 1 µl of 5x Hot FirePol Probe qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne OÜ, Estonia), 0.25 µl of 20x TaqMan Gene Expression Assay, 1.75 µl of nuclease-free water, and 2 µl of 8-times diluted cDNA to make a final reaction volume of 5 µl. PCR reaction was performed on 384-well position ViiA7 Real-Time PCR System (Life Technologies, CA, USA). The reaction mixture of cDNA from treated and untreated cell line samples contained 5 µl of 2x Gene Expression Master Mix (ROX) (ThermoFisher, MA USA), 0.5 µl of 20x TaqMan Gene Expression Assay, 2.5 µl of nuclease-free water, and 2 µl of 6-times diluted cDNA to make a final reaction volume of 10 µl. The PCR reaction was performed on 72-well position RG6000 system (Corbett Research, Australia). Cycling parameters of all reactions were initial hold at 50 °C for 2 minutes and 10 minutes denaturation at 95 °C followed by 45 cycles consisting of 15 seconds denaturation at 95 °C and 60 seconds annealing/extension at 60 °C. The non-template control (NTC) contained water instead of cDNA. Negative cDNA synthesis controls (RNA transcribed without reverse transcriptase) were also employed to reveal possible carry-over contamination. Samples were analyzed in duplicates; samples with a standard deviation of duplicates > 0.5 Ct were re-analyzed. Design of the qPCR study adhered to the MIQE guidelines [52].

#### 4.9. Immunoblotting analysis of protein expression

Western blot analyses were performed similarly as described previously [34]. Briefly, protein concentration in samples was determined using the Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher, MA, USA). Samples were separated in hand casted 12% polyacrylamide gels and blotted onto a 0.2 µm nitrocellulose membrane for 3 hours in Towbin buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol, pH 8.3). The membranes were blocked with 5% BSA in TBS buffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5). Following primary antibodies were applied onto the membranes and incubated overnight at 4 °C: *anti*-TRIP6 (HPA052813) and *anti*-Actin (clone AC-40) (A3853) from Merck (Darmstadt, Germany), *anti*-CPS1 [EPR7493-3] (ab129076) from Abcam (Cambridge, UK). Secondary HRP-conjugated antibodies, applied onto the washed membranes and incubated for 2 hours at room temperature, were goat *anti*-mouse (SA00001-1) and goat *anti*-rabbit (SA00001-2)

from Proteintech (Rosemont, IL, USA). Chemiluminescence signal was initiated using the enhanced SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher, MA, USA) and images were taken using a CCD camera GEL Logic 4000 Pro (Carestream Health, CT, USA).

#### 4.10. Statistical analyses

*In vitro* and *in vivo* estimated gene expression differences were calculated from raw Ct values as the fold change due to treatment in accordance with the comparative Ct method described by Livak and Schmittgen (2001). The  $2^{-\Delta Ct}$  method was used for relative quantification, and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method was used for fold change (FC) estimation in groups divided by the treatment with taxanes [53,54].

Statistical comparison between treated and untreated tumor cells and xenograft groups was performed by the two-tailed Student's t-test in GraphPad Prism v4.0 software (GraphPad Software, CA, USA). Protein levels were analyzed using densitometry performed in the Image Master™ 2D Platinum 6.0 software (GE Healthcare, Sweden). The transcript levels of target genes were normalized to reference genes listed in chapter 4.8 and protein levels to the level of  $\beta$ -actin control protein.

In ovarian carcinoma patient cohorts, mean Ct values of duplicates normalized to reference genes were used for calculating differences in transcript levels between tissue types using the REST 2009 Software (Qiagen, Germany), as published [55]. For relative gene expression, the  $2^{-\Delta Ct}$  method and standard deviation was used [54]. Associations of transcripts with clinical data – age at diagnosis in years; histological type of ovarian carcinoma (serous vs. other); histological grade, G1 or G2 vs. G3 or G4; FIGO stage, I or II vs. III or IV and Ki-67 expression in %, progression of disease, death, and resistance to therapy – were assessed by the non-parametric Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, and Spearman rank tests. Time to progression (TTP) was defined as the time elapsed between the surgical treatment and disease progression or cancer-related death. The survival functions were computed by the Kaplan-Meier method. Cut-offs defined by quartiles were tested and the “optimal cut-off” was defined as the highest statistical significance by the log-rank test. A P-value of <0.05 was considered statistically significant. All P-values are departures from two-sided tests. Statistical analyses were performed using SPSS v16.0 software (SPSS Inc., IL, USA). Type I error in single gene expression analyses was controlled by the false discovery rate (FDR) test according to Benjamini and Hochberg [56] and adjusted P-values are provided for each comparison except for *in vitro* and *in vivo* analyses.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.K. and P.S.; investigation, K.S., K.K., A.S., M.E., P.H., K.B., P.D., M.J. and R.V.; formal analysis, K.S. and R.V.; resources, L.R., M.H., M.M., C.W., I.O.; visualization, K.S., A.S. and R.V.; writing – original draft preparation, R.V., K.S. and A.S.; writing – review and editing, R.V., P.S. and J.K.; supervision, P.S. and J.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Czech Science Foundation, project no. 19-03063S (M.J., J.K., K.B., P.D., K.S., A.S.); the Czech Health Research Council, project no. NU20-09-00174 (K.K., P.H., M.E., M.H.), Charles University research program, project no. PROGRES Q28 (L.R.); the Czech Ministry of Education, Youth and Sports: Program INTER-EXCELLENCE, sub-program INTER-COST, project no. LTC19020 (M.M., P.S., R.V.) and the National Institutes of Health (NIH), U.S.A. grant R01 CA103314 (C.W., I.O.).

**Institutional Review Board Statement:** The study involving mouse tumor xenografts was conducted according to guidelines for tumor xenograft experiment and has been approved by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic and Ethical Committee of the National Institute of Public Health in Prague (Approved project no. MZDR 20330/2018-4/OVZ, date of approval: 18 May, 2018). The study involving a human subjects was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethical Committee of National Institute of Public Health (Approval no. EK-VP/25/0/2018).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** All the data are available upon reasonable request to the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Cancer of the Ovary - Cancer Stat Facts Available online: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html> (accessed on 25 April 2021).
2. Bowtell, D.D.; Böhm, S.; Ahmed, A.A.; Aspuria, P.-J.; Bast, R.C.; Beral, V.; Berek, J.S.; Birrer, M.J.; Blagden, S.; Bookman, M.A.; et al. Rethinking Ovarian Cancer II: Reducing Mortality from High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 668–679, doi:10.1038/nrc4019.
3. Rojas, V.; Hirshfield, K.M.; Ganesan, S.; Rodriguez-Rodriguez, L. Molecular Characterization of Epithelial Ovarian Cancer: Implications for Diagnosis and Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, doi:10.3390/ijms17122113.
4. Matz, M.; Coleman, M.P.; Carreira, H.; Salmerón, D.; Chirlaque, M.D.; Allemani, C.; CONCORD Working Group Worldwide Comparison of Ovarian Cancer Survival: Histological Group and Stage at Diagnosis (CONCORD-2). *Gynecol. Oncol.* **2017**, *144*, 396–404, doi:10.1016/j.ygyno.2016.11.019.
5. Stewart, C.; Ralyea, C.; Lockwood, S. Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Semin. Oncol. Nurs.* **2019**, *35*, 151–156, doi:10.1016/j.soncn.2019.02.001.
6. Ovarian Cancer Survival Rates | Ovarian Cancer Prognosis Available online: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html> (accessed on 25 April 2021).
7. Amoroso, M.R.; Matassa, D.S.; Agliarulo, I.; Avolio, R.; Maddalena, F.; Condelli, V.; Landriscina, M.; Esposito, F. Stress-Adaptive Response in Ovarian Cancer Drug Resistance: Role of TRAP1 in Oxidative Metabolism-Driven Inflammation. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **2017**, *108*, 163–198, doi:10.1016/bs.apcsb.2017.01.004.
8. Das, T.; Anand, U.; Pandey, S.K.; Ashby, C.R.; Assaraf, Y.G.; Chen, Z.-S.; Dey, A. Therapeutic Strategies to Overcome Taxane Resistance in Cancer. *Drug Resist. Updat.* **2021**, *55*, 100754, doi:10.1016/j.drug.2021.100754.
9. Boyd, L.R.; Muggia, F.M. Carboplatin/Paclitaxel Induction in Ovarian Cancer: The Finer Points. *Oncol. Williston Park N* **2018**, *32*, 418–420, 422–424.
10. Kim, A.; Ueda, Y.; Naka, T.; Enomoto, T. Therapeutic Strategies in Epithelial Ovarian Cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **2012**, *31*, 14, doi:10.1186/1756-9966-31-14.
11. Cortez, A.J.; Tudrej, P.; Kujawa, K.A.; Lisowska, K.M. Advances in Ovarian Cancer Therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2018**, *81*, 17–38, doi:10.1007/s00280-017-3501-8.
12. Lisio, M.-A.; Fu, L.; Goyeneche, A.; Gao, Z.-H.; Telleria, C. High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20040952.
13. Ojima, I.; Das, M. Recent Advances in the Chemistry and Biology of New Generation Taxoids. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 554–565, doi:10.1021/np8006556.
14. Ehrlichová, M.; Vaclavikova, R.; Ojima, I.; Pepe, A.; Kuznetsova, L.V.; Chen, J.; Truksa, J.; Kovar, J.; Gut, I. Transport and Cytotoxicity of Paclitaxel, Docetaxel, and Novel Taxanes in Human Breast Cancer Cells. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2005**, *372*, 95–105, doi:10.1007/s00210-005-1080-4.
15. Ehrlichová, M.; Koc, M.; Truksa, J.; Naldová, Z.; Vaclaviková, R.; Kovár, J. Cell Death Induced by Taxanes in Breast Cancer Cells: Cytochrome C Is Released in Resistant but Not in Sensitive Cells. *Anticancer Res.* **2005**, *25*, 4215–4224.
16. Vobořilová, J.; Němcová-Fürstová, V.; Neubauerová, J.; Ojima, I.; Zanardi, I.; Gut, I.; Kovár, J. Cell Death Induced by Novel Fluorinated Taxanes in Drug-Sensitive and Drug-Resistant Cancer Cells. *Invest. New Drugs* **2011**, *29*, 411–423, doi:10.1007/s10637-009-9368-8.
17. Němcová-Fürstová, V.; Kopperová, D.; Balušíková, K.; Ehrlichová, M.; Brynychová, V.; Vaclavíková, R.; Daniel, P.; Souček, P.; Kovár, J. Characterization of Acquired Paclitaxel Resistance of Breast Cancer Cells and Involvement of ABC Transporters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2016**, *310*, 215–228, doi:10.1016/j.taap.2016.09.020.
18. Oliverius, M.; Flasarova, D.; Mohelnikova-Duchonova, B.; Ehrlichova, M.; Hlavac, V.; Kocik, M.; Strouhal, O.; Dvorak, P.; Ojima, I.; Soucek, P. KRAS Pathway Expression Changes in Pancreatic Cancer Models by Conventional and Experimental Taxanes. *Mutagenesis* **2019**, *34*, 403–411, doi:10.1093/mutage/gez021.
19. Kovár, J.; Ehrlichová, M.; Smejkalová, B.; Zanardi, I.; Ojima, I.; Gut, I. Comparison of Cell Death-Inducing Effect of Novel Taxane SB-T-1216 and Paclitaxel in Breast Cancer Cells. *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 2951–2960.
20. Pavlikova, N.; Bartonova, I.; Dincakova, L.; Halada, P.; Kovar, J. Differentially Expressed Proteins in Human Breast Cancer Cells Sensitive and Resistant to Paclitaxel. *Int. J. Oncol.* **2014**, *45*, 822–830, doi:10.3892/ijo.2014.2484.
21. Pavlíková, N.; Bartoňová, I.; Balušíková, K.; Kopperova, D.; Halada, P.; Kovár, J. Differentially Expressed Proteins in Human MCF-7 Breast Cancer Cells Sensitive and Resistant to Paclitaxel. *Exp. Cell Res.* **2015**, *333*, 1–10, doi:10.1016/j.yexcr.2014.12.005.
22. Elsnerova, K.; Mohelnikova-Duchonova, B.; Cerovska, E.; Ehrlichova, M.; Gut, I.; Rob, L.; Skapa, P.; Hruda, M.; Bartakova, A.; Bouda, J.; et al. Gene Expression of Membrane Transporters: Importance for Prognosis and Progression of Ovarian Carcinoma. *Oncol. Rep.* **2016**, *35*, 2159–2170, doi:10.3892/or.2016.4599.

23. Xu, J.; Wu, J.; Fu, C.; Teng, F.; Liu, S.; Dai, C.; Shen, R.; Jia, X. Multidrug Resistant LncRNA Profile in Chemotherapeutic Sensitive and Resistant Ovarian Cancer Cells. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 5034–5043, doi:10.1002/jcp.26369.
24. Fernie, A.R.; Carrari, F.; Sweetlove, L.J. Respiratory Metabolism: Glycolysis, the TCA Cycle and Mitochondrial Electron Transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2004**, *7*, 254–261, doi:10.1016/j.pbi.2004.03.007.
25. Tait, S.W.G.; Green, D.R. Mitochondria and Cell Signalling. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 807–815, doi:10.1242/jcs.099234.
26. Tait, S.; Green, D. Mitochondrial Regulation of Cell Death. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, doi:10.1101/cshperspect.a008706.
27. Palmfeldt, J.; Bross, P. Proteomics of Human Mitochondria. *Mitochondrion* **2017**, *33*, 2–14, doi:10.1016/j.mito.2016.07.006.
28. Daniel, P.; Halada, P.; Jelínek, M.; Balušíková, K.; Kovář, J. Differentially Expressed Mitochondrial Proteins in Human MCF7 Breast Cancer Cells Resistant to Paclitaxel. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20122986.
29. Wang, C.; Wang, X.; Sun, Y.; Taouil, A.K.; Yan, S.; Botchkina, G.I.; Ojima, I. Design, Synthesis and SAR Study of 3rd-Generation Taxoids Bearing 3-CH<sub>3</sub>, 3-CF<sub>3</sub>O and 3-CHF<sub>2</sub>O Groups at the C2-Benzoate Position. *Bioorganic Chem.* **2020**, *95*, 103523, doi:10.1016/j.bioorg.2019.103523.
30. Markman, M.; Rothman, R.; Hakes, T.; Reichman, B.; Hoskins, W.; Rubin, S.; Jones, W.; Almadrones, L.; Lewis, J.L. Second-Line Platinum Therapy in Patients with Ovarian Cancer Previously Treated with Cisplatin. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **1991**, *9*, 389–393, doi:10.1200/JCO.1991.9.3.389.
31. Kaye, S.B. Management of Partially Platinum-Sensitive Relapsed Ovarian Cancer. *Eur. J. Cancer Suppl.* **2008**, *6*, 16–21, doi:10.1016/j.ejcsup.2007.12.003.
32. Litviakov, N.V.; Cherdynitseva, N.V.; Tsyganov, M.M.; Denisov, E.V.; Garbukov, E.Y.; Merzliakova, M.K.; Volkomorov, V.V.; Vtorushin, S.V.; Zavyalova, M.V.; Slonimskaya, E.M.; et al. Changing the Expression Vector of Multidrug Resistance Genes Is Related to Neoadjuvant Chemotherapy Response. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2013**, *71*, 153–163, doi:10.1007/s00280-012-1992-x.
33. Hansen, S.N.; Westergaard, D.; Thomsen, M.B.H.; Vistesén, M.; Do, K.N.; Fogh, L.; Belling, K.C.; Wang, J.; Yang, H.; Gupta, R.; et al. Acquisition of Docetaxel Resistance in Breast Cancer Cells Reveals Upregulation of ABCB1 Expression as a Key Mediator of Resistance Accompanied by Discrete Upregulation of Other Specific Genes and Pathways. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **2015**, *36*, 4327–4338, doi:10.1007/s13277-015-3072-4.
34. Jelínek, M.; Balušíková, K.; Daniel, P.; Němcová-Fürstová, V.; Kirubakaran, P.; Jaček, M.; Wei, L.; Wang, X.; Vondrášek, J.; Ojima, I.; et al. Substituents at the C3' and C3'' Positions Are Critical for Taxanes to Overcome Acquired Resistance of Cancer Cells to Paclitaxel. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, *347*, 79–91, doi:10.1016/j.taap.2018.04.002.
35. van der Schoor, L.W.E.; Verkade, H.J.; Kuipers, F.; Jonker, J.W. New Insights in the Biology of ABC Transporters ABCC2 and ABCC3: Impact on Drug Disposition. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2015**, *11*, 273–293, doi:10.1517/17425255.2015.981152.
36. Adamska, A.; Domenichini, A.; Capone, E.; Damiani, V.; Akkaya, B.G.; Linton, K.J.; Di Sebastiano, P.; Chen, X.; Keeton, A.B.; Ramirez-Alcantara, V.; et al. Pharmacological Inhibition of ABCC3 Slows Tumour Progression in Animal Models of Pancreatic Cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **2019**, *38*, 312, doi:10.1186/s13046-019-1308-7.
37. Adamska, A.; Ferro, R.; Lattanzio, R.; Capone, E.; Domenichini, A.; Damiani, V.; Chiorino, G.; Akkaya, B.G.; Linton, K.J.; De Laurenzi, V.; et al. ABCC3 Is a Novel Target for the Treatment of Pancreatic Cancer. *Adv. Biol. Regul.* **2019**, *73*, 100634, doi:10.1016/j.jbior.2019.04.004.
38. Auner, V.; Schouli, J.; Oskay-Oezcelik, G.; Horvat, R.; Speiser, P.; Zeillinger, R. ABC Transporter Gene Expression in Benign and Malignant Ovarian Tissue. *Gynecol. Oncol.* **2010**, *117*, 198–201, doi:10.1016/j.ygyno.2009.10.077.
39. Liu, N.; Zeng, J.; Zhang, X.; Yang, Q.; Liao, D.; Chen, G.; Wang, Y. [Involvement of miR-200a in chemosensitivity regulation of ovarian cancer]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **2014**, *94*, 2148–2151.
40. Shen, Y.; Yan, Z. Systematic Prediction of Drug Resistance Caused by Transporter Genes in Cancer Cells. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 7400, doi:10.1038/s41598-021-86921-9.
41. Lee, Y.-Y.; Li, C.-F.; Lin, C.-Y.; Lee, S.-W.; Sheu, M.-J.; Lin, L.-C.; Chen, T.-J.; Wu, T.-F.; Hsing, C.-H. Overexpression of CPS1 Is an Independent Negative Prognosticator in Rectal Cancers Receiving Concurrent Chemoradiotherapy. *Tumor Biol.* **2014**, *35*, 11097–11105, doi:10.1007/s13277-014-2425-8.
42. Xu, Y.; Yang, W.; Shi, J.; Zetter, B.R. Prohibitin 1 Regulates Tumor Cell Apoptosis via the Interaction with X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein. *J. Mol. Cell Biol.* **2016**, *8*, 282–285, doi:10.1093/jmcb/mjw018.

43. Ridder, D.A.; Schindeldecker, M.; Weinmann, A.; Berndt, K.; Urbansky, L.; Witzel, H.R.; Heinrich, S.; Roth, W.; Straub, B.K. Key Enzymes in Pyrimidine Synthesis, CAD and CPS1, Predict Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers* **2021**, *13*, doi:10.3390/cancers13040744.
44. Zhang, H.; Yang, S.; Wang, J.; Jiang, Y. Blockade of AMPK-Mediated CAMP-PKA-CREB/ATF1 Signaling Synergizes with Aspirin to Inhibit Hepatocellular Carcinoma. *Cancers* **2021**, *13*, doi:10.3390/cancers13071738.
45. Pham-Danis, C.; Gehrke, S.; Danis, E.; Rozhok, A.I.; Daniels, M.W.; Gao, D.; Collins, C.; Paola, J.T.D.; D'Alessandro, A.; DeGregori, J. Urea Cycle Sustains Cellular Energetics upon EGFR Inhibition in EGFR-Mutant NSCLC. *Mol. Cancer Res. MCR* **2019**, *17*, 1351–1364, doi:10.1158/1541-7786.MCR-18-1068.
46. de Cima, S.; Polo, L.M.; Díez-Fernández, C.; Martínez, A.I.; Cervera, J.; Fita, I.; Rubio, V. Structure of Human Carbamoyl Phosphate Synthetase: Deciphering the on/off Switch of Human Ureagenesis. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 16950, doi:10.1038/srep16950.
47. Çeliktas, M.; Tanaka, I.; Tripathi, S.C.; Fahrman, J.F.; Aguilar-Bonavides, C.; Villalobos, P.; Delgado, O.; Dhillon, D.; Dennison, J.B.; Ostrin, E.J.; et al. Role of CPS1 in Cell Growth, Metabolism and Prognosis in LKB1-Inactivated Lung Adenocarcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **2017**, *109*, 1–9, doi:10.1093/jnci/djw231.
48. Kim, J.; Hu, Z.; Cai, L.; Li, K.; Choi, E.; Faubert, B.; Bezwada, D.; Rodriguez-Canales, J.; Villalobos, P.; Lin, Y.-F.; et al. CPS1 Maintains Pyrimidine Pools and DNA Synthesis in KRAS/LKB1-Mutant Lung Cancer Cells. *Nature* **2017**, *546*, 168–172, doi:10.1038/nature22359.
49. Willier, S.; Butt, E.; Richter, G.H.S.; Burdach, S.; Grunewald, T.G.P. Defining the Role of TRIP6 in Cell Physiology and Cancer. *Biol. Cell* **2011**, *103*, 573–591, doi:10.1042/BC20110077.
50. Miao, X.; Xu, X.; Wu, Y.; Zhu, X.; Chen, X.; Li, C.; Lu, X.; Chen, Y.; Liu, Y.; Huang, J.; et al. Overexpression of TRIP6 Promotes Tumor Proliferation and Reverses Cell Adhesion-Mediated Drug Resistance (CAM-DR) via Regulating Nuclear P27(Kip1) Expression in Non-Hodgkin's Lymphoma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **2016**, *37*, 1369–1378, doi:10.1007/s13277-015-3939-4.
51. Soucek, P.; Anzenbacher, P.; Skoumalová, I.; Dvůrák, M. Expression of Cytochrome P450 Genes in CD34+ Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **2005**, *23*, 1417–1422, doi:10.1634/stemcells.2005-0066.
52. Bustin, S.A.; Benes, V.; Garson, J.A.; Hellemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W.; Shipley, G.L.; et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 611–622, doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
53. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods San Diego Calif* **2001**, *25*, 402–408, doi:10.1006/meth.2001.1262.
54. Özcan, Ö.; Belli, A.K.; Sakallı Çetin, E.; Kara, M.; Çelik, Ö.İ.; Kaplan, M.; Kayıhoğlu, S.I.; Dönmez, C.; Polat, M. Upregulation of SIRT1 Gene in Gastric Adenocarcinoma. *Turk. J. Gastroenterol. Off. J. Turk. Soc. Gastroenterol.* **2019**, *30*, 326–330, doi:10.5152/tjg.2019.18550.
55. Pfaffl, M.W.; Horgan, G.W.; Dempfle, L. Relative Expression Software Tool (REST©) for Group-Wise Comparison and Statistical Analysis of Relative Expression Results in Real-Time PCR. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e36.
56. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* **1995**, *57*, 289–300.